Synthese von Peptiden durch Kombination von Polymerreagentien mit solubilisierenden Trägern, sowie der 2 - Nitro - 1 - phenylethyl - Schutzgruppe

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Heusel
aus Tübingen
1978

78 195

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0077

Synthese von Peptiden durch Kombination von Polymerreagentien mit solubilisierenden Trägern, sowie der 2 - Nitro - 1 - phenylethyl - Schutzgruppe

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Heusel
aus Tübingen
1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	14. März 1978
Dekan:	Prof. Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Jung
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Günther Jung
in der Zeit von Januar 1975 bis Oktober 1977
im Chemischen Institut der Universität Tübingen
durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Günther Jung danke ich für die Themenstellung, für viele Anregungen und die wohlwollende Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer danke ich für die Überlassung von Institutseinrichtungen.

Dem Cusanuswerk, Bischöfliche Studienförderung, danke ich für ein Graduierten-Stipendium.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung 1

II. Die Methoden der Peptidsynthese
1. Die konventionelle Methode 2
2. Die Verwendung von Polymeren als Träger 3
2.1. Die Festphasenmethode 3
2.2. Die Flüssigphasenmethode 5
2.2.1. Analytik in der Flüssigphasenmethode 7
3. Die Polymer-Reagens Synthese 10

III. Peptidsyntheseverfahren unter Verwendung unlöslicher Polymerreagentien und solubilisierender makromolekularer Peptidträger 13
1. Syntheseprinzip 13
2. Solubilisierende Träger 15
3. Polymerreagentien auf Nitrophenolbasis 16
3.1. Frühere Arbeiten 16
3.2. Polymerreagentien mit Esterbindung 16
3.3. Polymerreagentien mit Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung 18
3.4. Beladung des Polymerreagens 18
3.5. Synthesen mit (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol 19
3.5.1. Abspaltung der Schutzgruppen 20
3.5.2. Reinigung und Charakterisierung 22
3.6. Mehrfache Verwendung und Regenerierung 23
4. Polymerreagentien mit 1-Hydroxybenzotriazol 25
4.1. Darstellung von polymergebundenem 1-Hydroxybenzotriazol 26
4.2. Beladung von polymergebundenem 1-Hydroxybenzotriazol 30

4.3. Modellkupplungen 31
4.3.1. Vergleich mit (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol 31
4.3.2. Abhängigkeit von der Molmasse des löslichen Trägers 33
4.4. Stabilität im Lösungsmittel 34
4.5. Abschließende Betrachtungen 35
5. Experimenteller Teil 37
5.1.1. Darstellung der N-geschützten Aminosäuren 37
5.1.2. Darstellung der N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-aminosäurepolyoxyethylenester 39
5.2. Darstellung von 4-Nitro-3-hydroxybenzoesäurepolystyrolester 41
5.3. Darstellung von Aktivestern mit (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol 42
5.4. Synthese der Tripeptide 43
5.4.1. Allgemeine Kupplungsvorschrift 43
5.4.2. Abspaltung der Tripeptide vom Polyoxyetylen 45
5.4.3. Abspaltung der Aminoschutzgruppen und Reinigung 45
5.5. Darstellung von polystyrolgebundenen 1-Hydroxybenzotriazol-Aktivestern 46
5.6. Synthesen mit polystyrolgebundenen 1-Hydroxybenzotriazol-Aktivestern 49
5.7. Durchführung der Analysen 50
5.7.1. Potentiometrische Titration 50
5.7.2. Aminosäureanalyse 50

IV. Verwendung von ß-Nitrostyrol als Schwefelschutzgruppe und Untersuchungen zur Konfiguration einiger Addukte 52
1. Die Bedeutung von Cystein in Peptiden und Proteinen 52
2. Peptidsynthesen mit Cystein 53
2.1. Addition von ß-Nitrostyrol als Thiolschutz 54

2.1.1.	Synthese von ß-Nitrostyrolen	55
2.1.2.	Synthese von Cystein und Glutathion Addukten	56
2.1.3.	Synthese eines 2-Nitro-1-phenylethyl-geschützten Tripeptids	59
2.1.4.	Abspaltung des 2-Nitro-1-phenylethyl-Restes	61
2.2.	Synthese von polymergebundenen ß-Nitrostyrolen	64
2.2.1.	Synthese von ß-Nitrostyrol an einer Polystyrolmatrix	64
2.2.2.	Synthese eines polymergebundenen löslichen ß-Nitrostyrols	65
2.2.3.	Additionsreaktionen mit polyoxyethylengebundenem ß-Nitrostyrol	67
3.	Entstehung und Trennung von diastereomeren ß-Nitrostyrol-Addukten	69
3.1.	Trennung durch fraktionierte Kristallisation	70
3.2.	Spektroskopische Untersuchungen	72
3.2.1.	Messungen des Circulardichroismus	72
3.2.2.	Messungen der kernmagnetischen Resonanz	76
3.3.	Chromatographische Untersuchungen	76
4.	Experimenteller Teil	77
4.1.1.	Darstellung von N-Benzyloxycarbonyl-L-alanin	77
4.1.2.	Darstellung von L-Alanin-tert.-butylesterhydrochlorid	77
4.1.3.	Darstellung von N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-L-cystein	79
4.2.	Darstellung von S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-cysteinyl-alanyl-alanin	81
4.3.	Darstellung von ß-Nitrostyrolen	84
4.3.1.	Darstellung von polystyrolgebundenem ß-Nitrostyrol	85

4.3.2. Darstellung von polyoxyethylengebundenem ß-Nitrostyrol 86
4.3.3. Darstellung der polymergebundenen Addukte 87
4.4.1. Darstellung von N-Acetyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-D-cystein 88
4.4.2. Darstellung von S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-cystein 89
4.4.3. Darstellung von S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-glutathion 89
4.5. Abspaltung der Schutzgruppe aus S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-Glutathion 90
5. Geräte und Reagentien 91
6. Abkürzungen 92

V. Zusammenfassung 93

VI. Literaturverzeichnis 94

I. Einleitung

Bei der Synthese von Peptiden ist der entscheidende Schritt die Ausbildung der Amidbindung. Sie verläuft nach dem allgemeinen Schema:

$$^{+}H_3N\text{-}CHR_1\text{-}COO^{-} + {}^{+}H_3N\text{-}CHR_2\text{-}COO^{-} \longrightarrow {}^{+}H_3N\text{-}CHR_1\text{-}CONHCHR_2\text{-}COO^{-} + H_2O$$

Diese Reaktion kann bei erhöhter Temperatur erfolgen, führt dann aber zu ungeordneten Polypeptiden. Ziel der Peptidsynthese ist es jedoch, Peptide einer bestimmten Sequenz unter Erhaltung der Konfiguration der eingesetzten Aminosäuren herzustellen. Aus diesem Grund arbeitet man zweckmäßigerweise bei Raumtemperatur. Dies erfordert zum einen die Aktivierung einer Kupplungskomponente, zum anderen die Blockierung der funktionellen Gruppen, die nicht an der Reaktion beteiligt werden sollen.

Die Blockierung der Carboxylfunktion der Aminokomponente erfolgt im allgemeinen durch Veresterung. Dies hat zudem den Vorteil, daß kein schwer acylierbares Zwitterion entstehen kann.

Die als Carboxylkomponente eingesetzte Aminosäure wird im Normalfall durch einen elektronenziehenden Substituenten aktiviert, der die Elektronendichte am Carboxyl-Kohlenstoff-Atom verringert. Das hat aber zur Folge, daß die Carboxylkomponente ebenso als acylierendes Agens auftreten kann, sofern sie nicht mit geschützter α-Aminofunktion eingesetzt wird. Diese N-Schutzgruppe muß ebenso wie die Carboxylschutzgruppe der Aminokomponente unter Bedingungen wieder abspaltbar sein, die das übrige Molekül unbeschädigt lassen.

Trifunktionelle Aminosäuren erfordern in den meisten Fällen Schutzgruppen für die Seitenketten, die mehrere Peptid-

syntheseschritte unbeschadet überstehen und am Schluß leicht abspaltbar sein müssen.

Die Planung einer Peptidsynthese erfordert insbesondere die Diskussion zweier Probleme: Die Strategie und die Taktik.

Es haben sich im wesentlichen vier Strategien herausgebildet:

- die konventionelle Synthese mit globaler Schutzgruppentechnik
- die konventionelle Synthese unter geringstmöglicher Maskierung der funktionellen Gruppen
- die Verwendung von Polymeren als Träger
- die konventionelle Synthese unter Verwendung von Polymerreagentien.

Die Taktik erfordert es, in enger Anlehnung an die Strategie, die richtige Wahl der Schutzgruppen für die α-Aminofunktion und die vielfältigen Seitenkettenfunktionen zu treffen. Besonders hingewiesen sei hier z.B. auf die Thiolgruppe des Cysteins, das in vielen natürlich vorkommenden Peptiden und Proteinen eine bedeutende Rolle einnimmt. Die Entwicklung einer neuen Peptidsynthesemethode sowie einer Schutzgruppe für Cystein waren Ziel der vorliegenden Arbeit.

II. Die Methoden der Peptidsynthese

1. Die konventionelle Methode

Obwohl die ersten Peptidsynthesen bereits E.Fischer gelungen sind (1), betrachtet man erst die Einführung des Benzyloxycarbonyl-Restes als reversible Aminoschutzgruppe durch M.Bergmann und L.Zervas als den eigentlichen Beginn

der Peptidsynthese (2).

Seither werden Peptide schrittweise vom C-terminalen Ende her synthetisiert. Zur Verknüpfung von so erstellten Fragmenten wird dann meistens die Azidkupplung angewendet.

Beim Aufbau eines Peptides ergeben sich bei geeigneter Wahl der Schutzgruppen anfangs keine Schwierigkeiten. Bei längeren Peptidketten sind jedoch durch deren Löslichkeit oft Grenzen gesetzt. So nimmt im Normalfall die Löslichkeit der wachsenden Peptidkette in gebräuchlichen Lösungsmitteln ab, und auch die Reinigung der Peptide gestaltet sich immer schwieriger, da bei jedem neuen Kupplungsschritt die Peptidkette dem nicht acylierten Fragment ähnlicher wird und sich deshalb mittels einfacher Reinigungsoperationen nicht mehr abtrennen läßt.

Um derartige Löslichkeitsprobleme zu umgehen, die Abtrennung der Überschüsse zu erleichtern und die Reinigungsschritte zu verkürzen, wurden neue Synthesestrategien entwickelt.

2. Die Verwendung von Polymeren als Träger

Die Peptidsynthese unter Verwendung von polymeren Trägern kann in stets "fester Phase" ("solid phase"), stets "flüssiger Phase" ("liquid phase") oder teils fester, teils flüssiger Phase - vom zeitlichen Ablauf her - erfolgen. Diese Methoden überraschen alle zunächst von ihrer scheinbaren Einfachheit her und bieten sich für eine weitgehende Mechanisierung bzw. eine Automatisierung der Peptidsythese geradezu an.

2.1. Die Festphasenmethode

In der bereits im Jahre 1963 von Merrifield entwickelten Festphasenmethode (3) wird in der Regel die C-terminale Aminosäure mit einem unlöslichen, schwach vernetzten Polystyrolträger verknüpft, und die Peptidkette stufenweise

durch Kupplung mit N-Acyl-aminosäuren aufgebaut. Um Fehlsequenzen zu vermeiden, ist es unbedingt erforderlich, daß diese Kupplungen quantitativ verlaufen, was meistens erhebliche Überschüsse an acylierten Aminosäurederivaten erfordert (4). Dies beinhaltet aber unter anderem die Gefahr, daß bestimmte Peptidbindungen wie z.B. am Glycin (5), N-acyliert werden, einschließlich der möglichen Folgen einer Kettenverkürzung und -verlängerung. Die Forderung der Festphasenmethode nach quantitativer Umsetzung der Aminokomponente erfordert zwangsläufig eine quantitative Demaskierung der gebildeten N-Acyl-peptidderivate. Eine sichere Aussage darüber ist jedoch ohne Abspaltung des Peptids vom Träger nicht ohne weiteres möglich. Außerdem liegt die Fehlergrenze der analytischen Methoden, die hierbei verwendet werden, noch in einer Größenordnung, die keine gesicherten Aussagen über eventuelle Fehlsequenzen zuläßt. Im übrigen erfordern solche Analysen einen Zeitaufwand, der den Vorteil der Festphasensynthese, nämlich die Schnelligkeit zum großen Teil wieder zunichte macht.

Beim Aufbau größerer Peptide dürfte die Quellbarkeit des meist verwendeten quervernetzten Polystyrolträgers entscheidend von der Peptidkette beeinflußt werden. Überdies muß eine ökonomische Beladung des Polymers als Faktor einkalkuliert werden. Vor allem wird auch die Beladungsdichte des Polymers aufgrund sterischer Hinderung je nach Art des synthetisierten Peptids früher oder später Bedeutung erlangen. Ferner ist zu berücksichtigen, daß Korngröße, Quellbarkeit, Vernetzung und Zahl und Verteilung der Ankergruppen herstellungsbedingt nicht exakt vorhersagbar sind.

Einen Spezialfall der Festphasensynthese stellt die sogenannte "Merrifield-Technik" dar. Hierbei wird die C-terminale Aminosäure unter Benzylesterbildung an ein Polymer geknüpft, das in der Regel ein Copolymerisat aus Polystyrol

mit 2 % Divinylbenzol ist. Nach Abspaltung der Aminoschutzgruppe wird der stufenweise Anbau entweder nach dem Carbodiimid - oder dem Aktivesterverfahren vollzogen. Dieser Anbau erfolgt bei den meisten der vielen bisher veröffentlichten Anwendungen unter gleichbleibenden Bedingungen bei jedem Schritt und ohne effektive Umsatzkontrolle oder Reinheitsüberprüfung. Da die Umsetzungsgeschwindigkeiten aber nicht nur von den beiden beteiligten Aminosäuren abhängen, sondern auch von der Größe und Art des Aminokomponenten-Polymers, d.h. der Konformation der Peptidkette mitsamt dem Festkörper, und außerdem ein Diffusionsprozeß überlagert ist, können die jeweiligen Umsetzungszeiten von Fall zu Fall stark differieren (6).

Diesem Aufbau folgt am Schluß die Abspaltung der Peptidkette vom Träger, meistens unter drastischen Bedingungen wie Bromwasserstoff/Trifluoressigsäure, wobei gleichzeitig fast alle Schutzgruppen mit abgespalten werden.

Diese Punkte lassen die Festphasenmethode für den gezielten Aufbau von Peptiden nicht als geeignet erscheinen, da das stets anfallende Peptidgemisch außerhalb des Oligopeptidbereichs selbst durch aufwendige Reinigungsoperationen nicht aufgetrennt werden kann.

2.2. Die Flüssigphasenmethode

Die Entwicklung der Flüssigphasenmethode ("Liquid-Phase Methode") basiert auf der Idee, die Vorteile der konventionellen und der Festphasenmethode zu verbinden, ohne deren Nachteile in Kauf nehmen zu müssen. Dies wird durch die von M.Mutter und E.Bayer (7,8) eingeführte, löslich machende Schutzgruppe Polyoxyethylen (POE, Polyethylenglykol, PEG) in hohem Maße erreicht. Bei dieser Synthesemethode wird die C-terminale N-Acyl-aminosäure mit Polyoxyethylen der Molmasse 6 000 - 20 000 verestert und das Peptid dann in flüssiger Phase aufgebaut.

Das Polyoxyethylen erfüllt also drei Aufgaben. Es dient als Träger zur Fixierung der ersten Aminosäure, wie bei der Festphasensynthese, es ist eine Carboxylschutzgruppe und drittens soll es selbst längere Peptide noch gut löslich machen. Aufgrund dieser Tatsache läßt sich eine Synthese von Peptiden am Polyoxyethylen durchaus mit der konventionellen Methode vergleichen, da durch die Umsetzung in homogener Phase die Reaktion schnell und kontrollierbar verläuft. Bestätigt wird dies durch Untersuchungen (9), die zu dem Ergebnis kommen, daß die Kinetik der Kupplung ähnlich wie bei niedermolekularen Methyl- oder Ethylgruppierungen als Carboxylschutzgruppe verläuft.

Wie bei der Festphasenmethode kann in der Flüssigphasenmethode mit großem Überschuß an Aminosäurederivaten gearbeitet werden, die sich meistens leicht und schnell durch Ausfällen des kristallisierenden Polyoxyethylenpeptids (Kristallisationsmethode) wieder entfernen lassen. Dies erfolgt mit Ether aus allen mit Ether mischbaren Lösungsmitteln, in denen Polyoxyethylen löslich ist, wie etwa Dichlormethan, Methanol, Ethanol, Essigester, Dimethylformamid und Eisessig. Hierbei wird ein feinkristallines Produkt erhalten, was durch eine röntgenographische Aufnahme gezeigt werden konnte (10). Zur Entfernung selbst von hartnäckigen Verunreinigungen hat sich das Auflösen des Polyoxyethylenpeptids in warmem Ethanol oder Methanol und anschließendes Ausfällen mit Ether besonders bewährt.

In der Flüssigphasenmethode können alle gängigen Kupplungsmethoden, wie z.B. die Anhydrid-, Aktivester- und Carbodiimid-Methode, auch unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol oder N-Hydroxysuccinimid, verwendet werden. Ebenso lassen sich normalerweise die in der konventionellen Synthese bewährten Schutzgruppen anwenden, einschließlich der Benzyl- und Benzyloxycarbonylverbindungen, die sich auch am Träger

hydrogenolytisch abspalten lassen.

2.2.1. Analytik in der Flüssigphasenmethode

Auch für die Flüssigphasenmethode gilt wie für jede andere Trägersynthese die Forderung nach quantitativem Umsatz und nach quantitativer Abspaltung der Aminoschutzgruppen. Bei der Flüssigphasenmethode ist es aber verglichen mit anderen Trägersynthesen besser möglich, durch einfache Methoden den Umsatz zu bestimmen und gegebenenfalls nachzukuppeln oder die Abspaltung zu wiederholen. Sollte sich hierbei kein Erfolg einstellen, müßte allerdings die Strategie geändert werden.

Am einfachsten läßt sich der Kupplungszyklus analytisch verfolgen, wenn man die Bestimmung der jeweils vorhandenen freien Aminogruppen heranzieht. Im Idealfall erhält man dann nach Abspaltung der Schutzgruppe 100 % freie Aminogruppen, während nach einer Kupplung keine freien Aminogruppen mehr vorhanden sein dürfen. Diese Idealwerte werden aber kaum von einem Verfahren erreicht werden. Immerhin sind in der Flüssigphasenmethode diese Werte annähernd und gut reproduzierbar mit Sicherheit zu erreichen.

Da auch in der Flüssigphasenmethode in der Regel keine Zwischenreinigung des wachsenden Peptids vorgenommen wird, muß man leistungsfähige analytische Kontrollen zur Verfügung haben, um Fehlsequenzen auszuschließen. Da man im Gegensatz zur Festphasenmethode hier auf jeder Stufe definierte Polymerpeptide vorliegen hat, kann mann durch Äquivalentanalysen gut reproduzierbare Ergebnisse erhalten. In der Praxis haben sich folgende Verfahren als geeignet erwiesen:

- Aminosäureanalyse
- Potentiometrische Titration
- Fluramtest
- Infrarotspektroskopie.

Die moderne Form der Aminosäureanalyse, z.B. durch Fluoreszenzdetektion, kann zur Bestimmung der Beladung, zur Produktanalyse und auch als Umsatztest (berechnet über das Verhältnis der Aminosäuren) herangezogen werden. Die Genauigkeit der Analyse ist bei modernen Geräten ebenso wie die Empfindlichkeit wesentlich höher, so daß nur geringe Substanzmengen verbraucht werden und die Fehler klein sind. Nachteilig wirkt sich der große Zeit- und Geräteaufwand aus, so daß sich diese Methode für Routineanalysen nur beschränkt eignet.

Die Infrarotspektroskopie eignet sich besonders bei sehr kurzen Peptiden zur schnellen Überprüfung auf vollständige Abspaltung von Urethanschutzgruppen. Das Infrarotspektrum, das mit Hilfe eines KBr-Presslings, ohne die bei Polystyrolträgern sich ergebenden Probleme aufgenommen wird, zeichnet sich dann durch das Fehlen der C=O Streckschwingungsbande bei 1 710 cm^{-1} aus. Auf diese Weise lassen sich noch 1 % nicht abgespaltene Schutzgruppe erkennen. Selbstverständlich versagt diese Methode bei Anwesenheit anderer Urethanschutzgruppen, die sich an Drittfunktionen befinden, wie z.B. der Benzyloxycarbonylgruppe.

Solange das Polymerpeptid sich in Wasser oder einem Wasser/Methanol Gemisch löst, ist eine potentiometrische Titration möglich (9). Diese Methode ist relativ einfach, schnell und bietet hinreichend genaue und reproduzierbare Ergebnisse. Sofern die Aminoschutzgruppen acidolytisch mit Chlorwasserstoff in Eisessig oder mit Trifluoressigsäure abgespalten werden, können die protoniert vorliegenden Aminogruppen potentiometrisch mit Natronlauge titriert werden. Die Schwierigkeiten, die bei der Festphasensynthese durch Quaternisierung und unspezifische Adsorption auftreten, werden hier vermieden.

Bei Verwendung eines Gerätes, das die aufgenommene Kurve

gleich differenziert, erhält man ein Titrigramm mit der entsprechenden Anzahl von Peaks. Die Erkennbarkeit der Wendepunkte bzw. die Peakschärfe hängt mit der Laugenstärke zusammen. Da der Abstand der beiden Äquivalenzpunkte ein Maß für die Menge freier Aminogruppen ist, kommt der leichten Erkennbarkeit der Wendepunkte große Bedeutung zu. Die Titration des Polymerpeptids, die stets absolute Werte liefert, ist also aufgrund ihrer Einfachheit und Sicherheit die Methode der Wahl bei der Synthese von Peptiden nach der Flüssigphasenmethode. Die für eine gesicherte Trägersynthese von Peptid-Naturstoffen mit über 15 Aminosäureresten geforderte Fehlergrenze der analytischen Methoden (6) wird von der potentiometrischen Titration erreicht (12).

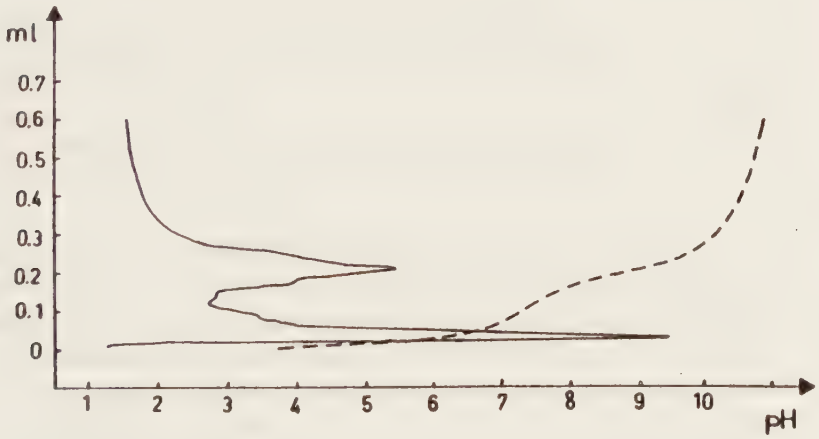


Abb. 1: Potentiometrische Titrationskurve bei der Bestimmung der freien Aminogruppe und ihre 1. Ableitung

Wegen des geringen Substanzbedarfs und der problemlosen Anwendung wird der Fluramtest (13,14) immer häufiger eingesetzt. Das Sprühreagens Fluram (Fluorescamin oder 4-Phenylspiro(furan-2(3H),1-phthalan)-3,3-dion) erlaubt

einen Umsatztest direkt aus der Kupplungslösung auf einer Dünnschichtplatte, ohne Vorreinigung. Die Empfindlichkeit liegt bei 0,1 nmol. Für quantitative Aussagen muß allerdings eine Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Eichkurve gemacht werden. Diese Eichlösungen werden zusammen mit einer bestimmten Menge der Probe auf einer Dünnschichtplatte entwickelt. Da das Polymerpeptid am Startfleck liegenbleibt und nur die niedermolekularen Substanzen wandern, wird die Startlinie mit Fluram besprüht und dann mit einem Scanner ausgewertet.

3. Die Polymer-Reagens Synthese

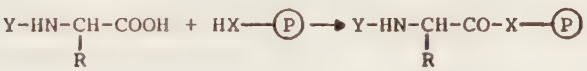
Eine interessante Möglichkeit Peptidsynthesen zu erleichtern, eröffnet sich durch die Anwendung von Polymerreagentien. Hierzu werden modifizierte Polymere gerechnet, die in der Lage sind, eine chemische Gruppierung auf ein gelöstes Molekül zu übertragen. Deutlich wird dies durch das folgende Schema:

$$\textcircled{P}\text{—A} + \text{B} \longrightarrow \textcircled{P} + \text{A-B}$$

Der Rest A, der über eine aktivierte Bindung an das Polymer gebunden ist, wird in der Reaktion auf das Molekül B unter Bildung von A-B übertragen. Die Verwendung solcher Polymerreagentien bietet den Vorteil, daß durch die bedenkenlose Anwendung hoher Überschüsse ein wesentlich gesteigerter Umsatz erzielt werden kann. Dies folgt aus der Tatsache, daß nach Beendigung der Reaktion das Polymerreagens einfach abfiltriert und anschließend wiederverwendet werden kann.

Allen bisher für die Peptidsynthese entwickelten Polymerreagentien gemeinsam ist die Umsetzung von Acylaminosäuren oder -peptiden zu polymer-aktivierten Carboxyderivaten und deren anschließende Verknüpfung mit Aminokomponenten ver-

schiedenster Art. Wie bei der klassischen Synthese kann man auch hier nach Kupplungsmethoden unterscheiden. Zum einen sind von Frankel (15) polymere Kupplungsreagentien auf der Basis von Carbodiimid eingeführt worden. Weitere polymere Kupplungsreagentien dieser Art wurden synthetisiert (16,17), sowie polymeres Phenylsulfonylchlorid (17) und eine polymere Form des Reagens N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (18). Weitaus vielversprechender scheint zum anderen jedoch die Gruppe der polymeren Aktivester zu sein, die fast gleichzeitig im Jahre 1965 von Katchalski (115) und Wieland (21) entwickelt wurden. Die erste Peptidsynthese mit derartigen Reagentien wurde allerdings von Katchalski (19) durchgeführt. Diese polymeren Aktivester werden aus den entsprechenden N-geschützten Aminosäuren gemäß folgendem allgemeinen Schema hergestellt:



Y = α-Aminoschutzgruppe, (P) = Polymerträger,
X = Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff

Der Polymerträger muß so modifiziert werden, daß er funktionelle Gruppen (z.B. Hydroxy- oder Thiolgruppen) enthält, die mit der Carboxylgruppe der N-geschützten Aminosäure zu einem Aktivester umgesetzt werden können. Einige der bisher erprobten Polymere zeigt Abbildung 2.

Die Kupplung des Aminosäurederivates an das Polymer wird in einem geeigneten organischen Lösungsmittel unter Verwendung der üblichen Kupplungsreagentien für die Aktivestersynthese, wie z.B. Dicyclohexylcarbodiimid oder gemischtes Anhydrid, durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion werden die Überschüsse an löslichen Reagentien einfach ausgewaschen und das Polymer kann nach Trocknung sofort zur Synthese eingesetzt

werden. Selbstverständlich besteht aber auch die Möglichkeit, das beladene Polymer einige Zeit aufzubewahren. Für die Synthese wird das Polymer in einem organischen Lösungsmittel wie Methylenchlorid oder Dimethylformamid suspendiert und mit dem gelösten Aminosäureester gekuppelt. Zweckmäßigerweise setzt man das Polymerreagens je nach Reaktivität in einem 2 - 5 fachen Überschuß ein. Das N- und C-terminal geschützte Dipeptid wird nach Abfiltrieren des Polymers durch einfaches Eindampfen des Lösungsmittels gewonnen. Nach Abspaltung der N-Schutzgruppe kann dann eine weitere Kupplung mit einem anderen polymeren Aktivester erfolgen. Durch Wiederholung des angegebenen Zyklus lassen sich so Peptidketten mit der gewünschten Sequenz aufbauen.

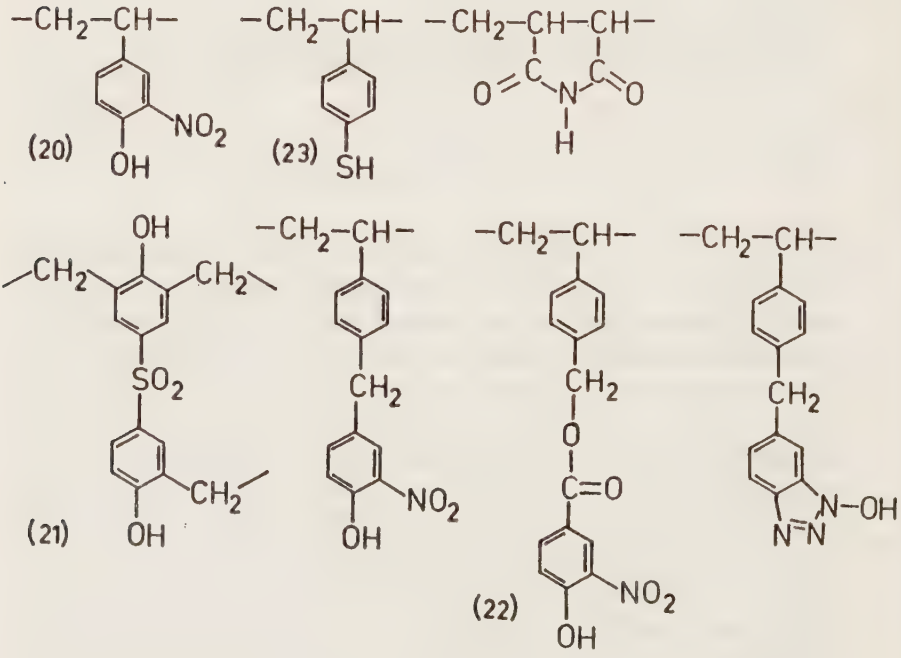


Abb. 2: Polymere zur Herstellung polymerer Aktivester

Die bisherigen experimentiellen Daten zeigen, daß die Ausbeuten bei dieser Synthesemethode mit 90 - 100 % für den einzelnen Kupplungsschritt sehr hoch liegen (20). Daraus folgt aber, daß sich Produkte mit großer Reinheit ergeben, was wiederum die Möglichkeit eröffnet, im Säulendurchlaufverfahren zu arbeiten.

III. Peptidsyntheseverfahren unter Verwendung unlöslicher Polymerreagentien und solubilisierender, makromolekularer Peptidträger

Eine Peptidsynthese muß nicht unbedingt streng nach einer der vier erwähnten Strategien erfolgen. Einerseits kann die Strategie im Lauf der Synthese gewechselt werden, andererseits sind auch Kombinationen der Strategien möglich.

1. Syntheseprinzip

Bei dem neuen Peptidsyntheseverfahren (24,25) handelt es sich um eine Kombination der Flüssigphasenmethode mit der Polymer-Reagens Methode. Diese Kombination erscheint sinnvoll, weil sie zu prinzipieller Vereinfachung und Verbesserung führt, da hier erstmals bei Peptidkupplungen weder lösliche oder schwer lösliche Nebenprodukte entstehen, noch überschüssige, gelöste Kupplungskomponenten entfernt werden müssen. Weiterhin können die Vorteile der Flüssigphasenmethode (keine verminderte Löslichkeit der wachsenden, voll geschützten Peptidkette, exakte Umsatzkontrollen) und der Polymerreagentien (Vorratshaltung aktivierter, N-geschützter Aminosäurederivate, Regenerierung der Polymerharze, verfahrenstechnisch einfache und günstige Handhabung im diskontinuierlichen oder Säulendurchlaufverfahren) für dieses Syntheseverfahren übernommen werden. Bei diesem Verfahren werden C-terminal an lösliche, poly-

mere Träger gebundene Peptide zur Kettenverlängerung quantitativ mit aktivierten; N-geschützten Aminosäureestern, die an eine unlösliche Matrix gebunden sind, umgesetzt.

Schematisch läßt sich der Synthesezyklus wie folgt darstellen (Abb. 3).

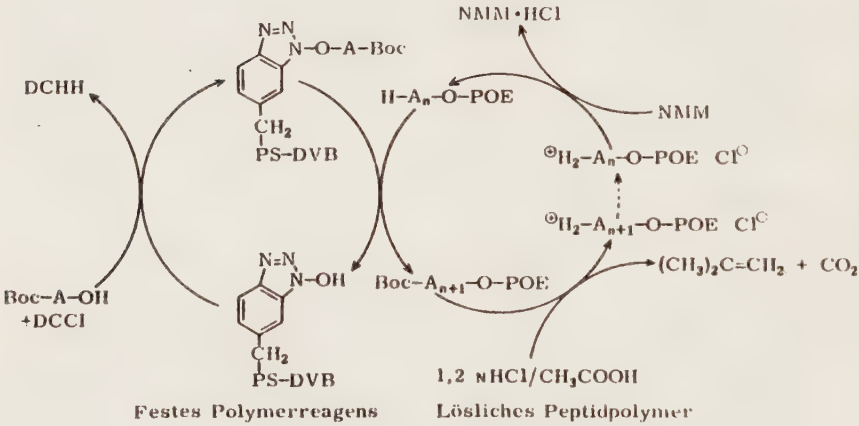


Abb. 3: Reaktionsschema zur Peptidsynthese durch Kupplung von Polymerreagentien mit löslichen Peptidpolymeren am Beispiel von polymergebundenem 1-Hydroxybenzotriazol.

A = Aminosäure, Boc = tert.-Butyloxycarbonyl, DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid, DCHH = Dicyclohexylharnstoff, NMM = N-Methylmorpholin, POE = Polyoxyethylen, PS-DVB = 2 % quervernetztes Polystyrol/Divinylbenzol.

Der Synthesezyklus besteht bei repetitiver Synthese also aus folgenden Schritten (Abb. 3):

1. Abspaltung der intermediären Aminoschutzgruppe des löslichen Polymerpeptids mit einer der üblichen Methoden. Danach wird das Polymerpeptid ausgefällt, neutral gewaschen, mittels Dünnschichtchromatographie auf Reinheit geprüft (das Polymerpeptid hat in den üblichen Laufmitteln einen R_f-Wert = 0, es genügen also kurze Laufzeiten) und dann getrocknet.

2. Kupplungsschritt: Das trockene Polymerpeptid wird in einem Lösungsmittel, wie z.B. Dichlormethan gelöst, und das Polymerreagens mit der entsprechenden Aminosäure darin suspendiert. Mit N-Methylmorpholin wird der pH-Wert auf 7 - 8 eingestellt und während der Reaktion konstant gehalten. Nach Beendigung der Reaktion wird das Polymerreagens abfiltriert, das Polymerpeptid mit Ether gefällt und zur Entfernung der Base umkristallisiert.

3. Umsatztest: Der Umsatz wird mittels Titration bestimmt, falls nötig wird sofort Schritt 2 wiederholt, sonst kann der Zyklus neu beginnen.

2. Solubilisierende Träger

Als solubilisierende Träger werden kristallisierbare Polyoxyethylene verschiedener Kettenlänge (Molmassen: 6 000, 10 000 und 20 000) verwendet, wie sie in der Flüssigphasenmethode eingesetzt werden. Die Auswahl der Kettenlänge orientiert sich hauptsächlich an der Molmasse des zu synthetisierenden Peptids. Die Verknüpfung der C-terminalen Aminosäure mit dem Träger erfolgt durch Veresterung der

endständigen Hydroxylgruppen des Polyoxyethylens mit einer N-geschützten Aminosäure nach der Dicyclohexylcarbodiimid- oder Säureanhydrid-Methode.

3. Polymerreagentien auf Nitrophenolbasis

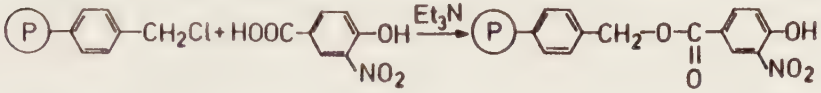
3.1. Frühere Arbeiten

Bereits 1965 konnte Fridkin zeigen, daß Poly(4-hydroxy-3-nitrostyrol), das mit Benzoesäure oder Essigsäure verestert ist, sich als Acylierungsmittel für Amine eignet (19). Dieses Polymerreagens wurde in einer Peptidsynthese auch eingesetzt. Trotz eines Erfolges scheiterte der weitere Einsatz dieses Polymers an vielen Unannehmlichkeiten. Die pulverige Form bereitete Schwierigkeiten bei der Filtration und beim Auswaschen, und manche Chargen lösten sich sogar teilweise in den verwendeten Lösungsmitteln. Außerdem konnte dieses Polymer nur in hochpolaren Lösungsmitteln gequollen werden, welche in der Peptidsynthese nicht immer wünschenswert sind. Deswegen begann man nach Polymerreagentien zu suchen, die sowohl chemisch reaktiv sein als auch bestimmte physikalische Eigenschaften aufweisen sollten. Die einfachste Lösung eröffnete sich in der Verwendung von vorgefertigten, polymeren Trägern, wie sie aus der Merrifield-Synthese bekannt sind. Allerdings mußten diese durch eine geeignete chemische Reaktion so modifiziert werden, daß das Trägergerüst nicht beeinträchtigt, also die physikalischen Eigenschaften nicht verändert wurden.

3.2. Polymerreagentien mit Esterbindung

Eine einfache Synthese für Polymerreagentien aus vorgefertigten Trägern und Nitrophenol entwickelten Panse und Laufer. Als Träger wurde quervernetztes Polystyrol gewählt, weil es gut bekannte und geeignete physikalische und chemische Eigenschaften aufweist und weil es käuflich erhältlich ist.

Dieses Polystyrol wurde mit 4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäure unter Zusatz von Triethylamin in Ethanol nach folgender Gleichung umgesetzt (22):



Die beiden Autoren gaben für dieses Polymer etwa 0.6 mmol freie OH-Gruppen/g an, die sie mittels Dicyclohexylcarbodiimid innerhalb 18 Stunden vollständig mit einer N-geschützten Aminosäure verestern konnten.

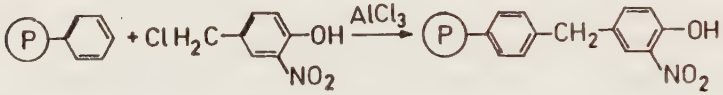
Das im Rahmen dieser Arbeit nach Panse und Laufer hergestellte Polymer wies zwar bis zu 1.0 mmol freie OH-Gruppen/g auf, eine ähnlich hohe Beladung konnte aber nicht erreicht werden. So ließ sich mittels Dicyclohexylcarbodiimid bei kurzen Reaktionszeiten nur N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin verestern. Um eine Beladung von 0.3 mmol/g bei N-α-tert.-Butyloxycarbonyl-N-δ-benzyloxycarbonyl-L-ornithin zu erreichen, mußte bereits mit 9-fachem Überschuß an Aminosäure etwa 100 Stunden mit Diciclohexylcarbodiimid gekuppelt werden. Abgesehen von der hohen Racemisierungsgefahr ist dieser große Zeitaufwand nicht tragbar.

Das so hergestellte Polymer wurde nun zur Synthese von Alanin und Ornithin enthaltenden Tripeptiden nach dem neuen Syntheseverfahren eingesetzt. Störend erwies sich von Anfang an die unbefriedigende Beladung des Harzes, die etwa zwischen 0.2 und 0.4 mmol Aminosäure/g Harz lag. Aus arbeitstechnischen Gründen sollte sie aber zwischen 0.8 und 1.5 mmol Aminosäure/g liegen. Ferner zeigte sich schon nach wenigen Syntheseversuchen, daß weniger bei Alanin, grundsätzlich jedoch bei polymeraktiviertem Ornithin, Nebenprodukte unbekannter Art entstanden. Dies dürfte auf die Benzylesterbindung der Nitrophenolcarbonsäure zum Harz zurückzuführen sein, die wahrscheinlich nicht genügend stabil

ist. Aus diesem Grund wurde von einer weiteren Verwendung dieses Harzes abgesehen.

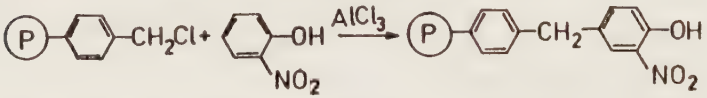
3.3. Polymerreagentien mit Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung

Um eine unter Kupplungsbedingungen stabile Bindung zu erhalten, wurde von Fridkin (26) ein Weg ausgearbeitet, der zu einer Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung des Nitrophenols zum Polystyrolträger führt. Hierbei wurde in einer Friedel-Crafts-Alkylierung 4-Hydroxy-3-nitrobenzylchlorid mit Aluminiumchlorid als Katalysator mit einem Copolymeren aus Polystyrol und Divinylbenzol nach folgender Gleichung umgesetzt.



(1)

Vorgeschlagen wurde auch folgender Weg (26), der aber trotz der leichter erhältlichen Ausgangsmaterialien nicht weiter verfolgt wurde, da er nur unbefriedigende Ergebnisse lieferte (0.02 mmol freie OH-Gruppen/g Harz).



(2)

Dem gegenüber enthielt das nach Gleichung (1) erhaltene (4-Hydroxy-3-nitro)-benzylierte Polystyrol (= PHNB) etwa 1.5 - 2,0 mmol Stickstoff/g Harz. Dies erlaubt die Schlußfolgerung, daß etwa ebensoviele freie OH-Gruppen vorhanden sein mußten. Dieses Ergebnis war sowohl mit der Elementaranalyse als auch mit einer entsprechenden Gewichtszunahme des Harzes in guter Übereinstimmung.

3.4. Beladung des Polymerreagens

Die Darstellung des polymergebundenen Aminosäureaktivesters erfolgte so, wie dies bei Aktivestern üblich ist. In diesem Falle erwies es sich als besonders einfach, wenn das Polymer-

reagens in einem Lösungsmittel wie Dichlormethan suspendiert wurde, die N-geschützte Aminosäure in 2 - 4 fachem Überschuß im gleichen Lösungsmittel zugegeben wurde und dann bei 0° C die entsprechende Menge an Dicyclohexylcarbodiimid zugesetzt wurde. Nach etwa 30 Minuten ließ man dann noch 5 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Die Entfernung der überschüssigen Aminosäure erfolgte durch Filtration; der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff mußte ausgewaschen werden, was am besten mit einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol gelang.

Der so hergestellte polymere Aktivester konnte nun nach guter Trocknung sofort zur Synthese eingesetzt werden, ließ sich aber auch einige Zeit lagern, ohne daß die Reaktivität darunter litt.

Die Bestimmung der Beladung erfolgte durch eine Aminosäureanalyse. Die Hydrolyse des Esters mußte dazu aber in alkalischer Lösung erfolgen, da eine saure Hydrolyse derartige Aktivester nicht quantitativ spaltet. In Übereinstimmung mit der Gewichtszunahme ergaben sich Beladungen zwischen 0.5 mmol/g bei Ornithin-Derivaten und 1.3 mmol/g bei Alanin-Derivaten.

3.5. Synthesen mit (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol

Zur Erprobung des neuen Peptidsyntheseverfahrens wurden mit (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol als Polymerreagens Tripeptide synthetisiert, die Alanin und Ornithin enthalten. Es wurden zu mikrobiologischen Test mit dem Oligopeptid-Transportsystem von Escherichia coli alle sieben denkbaren Kombinationen außer Tri- L-alanin hergestellt.

Das zunächst überraschendste Ergebnis war, daß keinerlei Komplikationen bei der heterogenen Reaktion der beiden Polymere auftraten. Es ließen sich nach dieser Methode

sogar quantitative Umsätze erzielen, sofern 5 - 10 fache Überschüsse angewendet wurden und nicht umgesetztes Polymerpeptid entsprechend nachgekuppelt wurde. Hierbei konnte in Übereinstimmung mit ähnlichen Versuchen von Weygand (27) festgestellt werden, daß eine Verlängerung der Kupplungszeit auf etwa 60 Stunden weniger sinnvoll ist, als eine erneute Zugabe von Polymerreagens nach 15 - 20 Stunden. Das heißt eine oder mehrere kürzere Nachkupplungen sind effizienter als ein einmalig hoher Überschuß mit langer Kupplungszeit. Die für die einzelnen Kupplungsschritte verwendeten Überschüsse und die Kupplungszeiten, sowie der Umsatz sind in Tabelle 1 (s. S. 21) zusammengestellt.
Der Umsatz wurde durch potentiometrische Titration bestimmt, von einigen polymergebundenen Tripeptiden wurde außerdem eine Aminosäureanalyse durchgeführt. Die Abspaltung der intermediären tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe erfolgte durch 20-minütige Behandlung mit Chlorwasserstoff in Eisessig. Zur Neutralisation wurde N-Methylmorpholin verwendet. Wie sich aus der Tabelle 1 entnehmen läßt, bestehen erhebliche Unterschiede im Umsatz bei gleichem Überschuß an polymergebundenem Aminosäureaktivester. Dies dürfte zum einen darauf zurückzuführen sein, daß Ornithin sicher schlechter kuppelt als Alanin, zum anderen darauf, daß lösliche Träger mit unterschiedlicher Molmasse verwendet wurden. C-terminales Alanin war mit 78 prozentiger Beladung an Polyoxyethylen der Molmasse 6 000, C-terminales Ornithin mit 56 prozentiger Beladung an solches der Molmasse 10 000 gebunden.

3.5.1. Abspaltung der Schutzgruppen

Die Abspaltung der Tripeptide vom Polyoxyethylen erfolgte unter alkalischen Bedingungen. So wurde das Polymerpeptid in 0.1 N Natronlauge suspendiert und etwa 2 Stunden bis zur Auflösung gerührt. Die wäßrige, alkalische Lösung wurde filtriert, mit verdünnter Salzsäure neutralisiert und lyophilisiert. Zur Entfernung der Hauptmenge an Polyoxyethylen

Tabelle 1: Übersicht über die Kupplungszeiten, verwendete Überschüsse und erzielte Umsätze bei der Synthese der Alanin/Ornithin-Peptide

Dipeptid-Polymerester	1. Kupplung			2. Kupplung			3. Kupplung		
	Überschuß	Zeit [h]	Umsatz [%]	Überschuß	Zeit [h]	Umsatz [%]	Überschuß	Zeit [h]	Umsatz [%]
BOC-L-Ala-Ala-O-POE_6	8	26	89	8	20	97			
BOC-L-Ala-Orn(Z)-O-POE_{10}	10	24	72	6	20	90	5	20	99
BOC-L-Orn(Z)-Ala-O-POE_6	8	20	48	8	30	86	5	20	99
BOC-L-Orn(Z)-Orn(Z)-O-POE_{10}	8	24	47	8	20	83	5	15	97

Tripeptid-Polymerester	1.Kupplung			2. Kupplung		
	Überschuß	Zeit h	Umsatz %	Überschuß	Zeit h	Umsatz %
BOC-L-Ala-Orn(Z)-Ala-O-POE_6	10	30	89	10	15	97
BOC-L-Orn(Z)-Orn(Z)-Ala-O-POE_6	10	30	54	10	30	96
BOC-L-Orn(Z)-Ala-Orn(Z)-O-POE_{10}	10	30	73	10	30	96
BOC-L-Ala-Ala-Orn(Z)-O-POE_{10}	8	30	82	8	20	95
BOC-L-Orn(Z)-Ala-Ala-O-POE_6	10	30	75	10	30	97
BOC-L-Ala-Orn(Z)-Orn(Z)-O-POE_{10}	10	30	82	10	20	97
BOC-L-Orn(Z)-Orn(Z)-Orn(Z)-O-POE_{10} [+]	10	30	62	8(8)	20(20)	89[+](97)

[+] Hier wurde eine dritte Kupplung erforderlich, die Werte sind in Klammer angegeben.

wurde der weiße Rückstand in warmem Ethanol gelöst, die Lösung zur Kristallisation des Polyoxyethylens über Nacht gekühlt und danach filtriert. Die klare Lösung wurde eingedampft und der Rückstand ohne weitere Reinigung zur Abspaltung der Aminoschutzgruppen mit Bromwasserstoff in Eisessig behandelt. Das freie Peptid wurde mit Ether ausgefällt, abfiltriert und gut getrocknet.

Bei den zwei und drei Ornithin-Resten enthaltenden Tripeptiden konnte mit Wasserunlöslichkeit gerechnet werden. Deshalb wurde die alkalische Lösung bis auf einen pH-Wert von etwa 3 angesäuert, um die N-geschützten Tripeptide auszufällen und sie danach abzuzentrifugieren. Nach Trocknung erfolgte die Abspaltung der Aminoschutzgruppen.

3.5.2. Reinigung und Charakterisierung

Um die noch vorhandenen Reste an Polyoxyethylen zu entfernen, wurden die Tripeptide in wasserfreiem Dichlormethan suspendiert und mehrere Stunden gerührt. Der jeweilige Rückstand wurde abfiltriert, getrocknet, in wenig Wasser aufgenommen und mit verdünnter Natronlauge neutralisiert. Die letzten Verunreinigungen wurden dann durch Gelchromatographie an Sephadex G-15 entfernt. In den meisten Fällen ergaben sich sechs Fraktionen, wobei in der ersten stets noch Polyoxyethylen-Reste zu finden waren. Der größte Peak der folgenden Gruppe enthielt das gesuchte Tripeptid. Die restlichen Peaks enthielten Alanin, Ornithin und nicht identifizierte Verunreinigungen. Die Fraktionen I - VI wurden lyophilisiert und mit Dünnschichtchromatographie bzw. -elektrophorese auf Einheitlichkeit untersucht. Hier konnten auch Alanin (Fraktion II und III) und Ornithin (Fraktion V und VI) mittels Referenzsubstanz identifiziert werden. Eine Charakterisierung der Tripeptide wurde mittels Aminosäureanalyse vorgenommen, deren Ergebnisse die Tabelle 2 (s. S. 24) zeigt.

Die synthetisierten Tripeptide wurden mikrobiologisch auf ihre Aktivität bzw. ihr Verhalten gegenüber dem Oligopeptid-Transportsystem von Escherichia coli geprüft. Hierbei sind außer bei Tri-L-ornithin keine Wirkungen auf gramnegative oder grampositive Bakterien festgestellt worden. Jedoch ist eine Aufnahme durch das Oligopeptid-Transportsystem mit Sicherheit erfolgt (28).

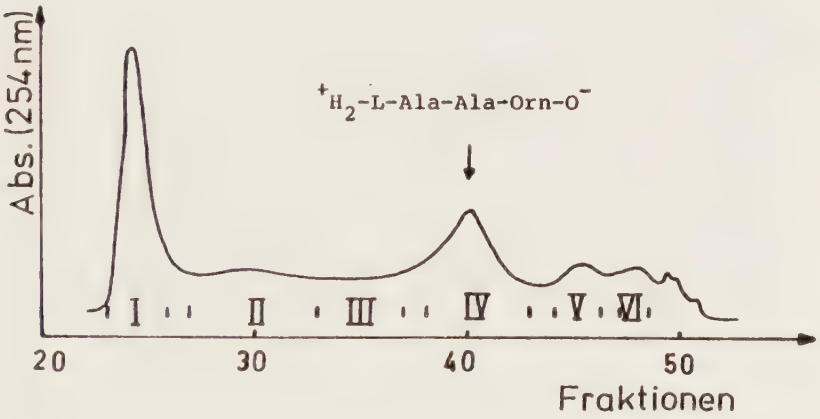


Abb. 4: Elutionsdiagramm des Rohprodukts L-Alanin-alanyl-ornithin auf einer Sephadex G-15-Säule. Elutionsmittel: Wasser

3.6. Mehrfache Verwendung und Regenerierung

Eine der unabdingbaren Voraussetzungen für die Brauchbarkeit der neuentwickelten Synthesemethode war die mehrmalige Verwendbarkeit des Polymeraktivesters für einige Synthesen und die Möglichkeit, danach das Harz erneut mit Aminosäure zu beladen.

Im Verlauf der Synthese der sequenzvariierten Tripeptide bot sich ein derartiger Einsatz besonders an. Es konnte eine

Tabelle 2: Ausbeuten und Aminosäureanalysen der synthetisierten Tripeptide

Peptid	Mol-masse	POE-Peptid [g]	Pept. [mmol]	Rohprodukt [mg]	Rohprodukt [%]	reines Peptid [mg]	reines Peptid [%]	Aminosäureanalyse Ala/Orn Ber.	Aminosäureanalyse Ala/Orn Gef.
$^{+}H_2$-L-Ala-Orn-Ala-O^{-}	274	1.1	0.28	36	47	15	20	2 : 1	- -
$^{+}H_2$-L-Orn-Orn-Ala-O^{-}	317	1.6	0.41	73	56	30	23	1 : 2	1.00 : 1.88
$^{+}H_2$-L-Orn-Ala-Orn-O^{-}	317	4.0	0.45	83	58	48	34	1 : 2	1.00 : 1.94
$^{+}H_2$-L-Ala-Ala-Orn-O^{-}	274	3.5	0.39	68	63	37	34	2 : 1	2.00 : 0.94
$^{+}H_2$-L-Orn-Ala-Ala-O^{-}	274	2.3	0.59	62	38	23	14	2 : 1	2.00 : 1.06
$^{+}H_2$-L-Ala-Orn-Orn-O^{-}	317	4.5	0.50	104	66	62	39	1 : 2	- -
$^{+}H_2$-L-Orn-Orn-Orn-O^{-}	360	3.4	0.38	101	73	64	46	0 : 3	- -

Verwendete Träger: Polyoxethylen

H-L-Ala-O-POE: Molmasse 6 000, Beladung 78 % (1 g = 0.26 mmol)

H-L-Orn(Z)-O-POE: Molmasse 10 000, Beladung 56 % (1 g = 0.11 mmol)

größere Menge Harz zu mehreren Kupplungen verwendet werden. Im Anschluß an jede Kupplung wurde dabei die Beladung des Harzes mittels Aminosäureanalyse kontrolliert. Die Beladungsabnahme entsprach jeweils der für die Kupplung verbrauchten Menge an Aminosäure. Dies gestattete den Schluß, daß bei der Kupplung tatsächlich nur soviel aktivierte Aminosäure vom Harz wegreagierte, wie benötigt wurde. Das Harz scheint also auch im Lösungsmittel stabil zu sein, so daß keine Verunreinigungen durch freigesetzte Aminosäurederivate zu erwarten sind. Polymerreagentien, bei denen die Beladung auf etwa 0.3 mmol Aminosäure/g Harz abgesunken war, konnten erneut mittels Dicyclohexylcarbodiimid innerhalb von 5 Stunden mit N-geschützten Aminosäuren beladen werden. Die Beladung entsprach dann in etwa wieder der anfangs erhaltenen. Diese erneut beladenen Polymerreagentien zeigten in darauf folgenden Synthesen das gleiche Verhalten wie zum ersten Mal beladene, so daß die Voraussetzung zur Wiederbeladung experimentell bewiesen wurde.

4. Polymerreagentien mit 1-Hydroxybenzotriazol

Trotz des Erfolgs bei der Synthese der Alanin/Ornithin-Tripeptide, konnte die Anwendung von (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol aus mehreren Gründen nicht zufrieden stellen. So sind die langen Reaktionszeiten und die benötigten hohen Überschüsse an Aminosäurederivaten aus ökonomischer Sicht nicht tragbar. Auch darf bei der Herstellung des polymergebundenen Aminosäureaktivesters die Gefahr der Racemisierung nicht unterschätzt werden. Die schon lange bekannte hohe Reaktivität von N-Alkyloxycarbonyl-aminosäuren, die mit dem von E.Wünsch (29) eingeführten N-Hydroxysuccinimid oder dem von W.König und R.Geiger (30) eingeführten 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) aktiviert waren, legte den Gedanken nahe, polymergebundenes N-Hydroxysuccinimid oder 1-Hydroxybenzotriazol zu entwickeln. Zudem bieten solche Reagentien eine große Garantie vor Racemisierung, da diese die Basizität der Aminokomponente und des Carbodiimids

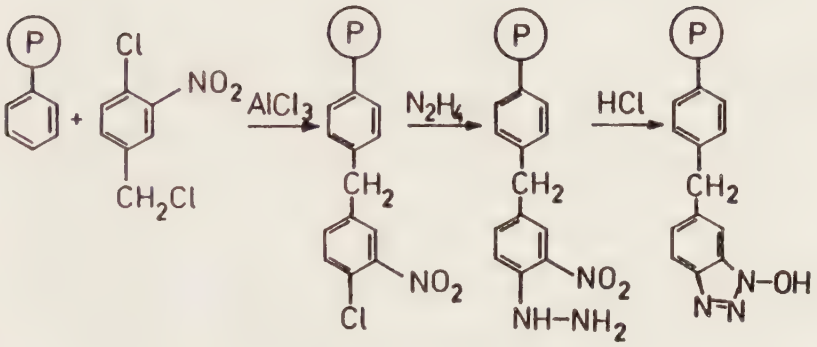
mindern. Damit wird deren katalytischer Einfluß auf die Isomerisierung eventuell gebildeter 1,3-Oxazolin-5-one eliminiert und eine Stabilisierung des aktiven Zustandes, sowie eine rasche racemisierungsfreie Öffnung gewährleistet (31).

M.Akiyama et al. gewannen solche Polymerreagentien indem sie N-Hydroxymaleimidester von N-geschützten Aminosäuren mit geeigneten Vinylmonomeren copolymerisierten (32). Die Herstellung des Polymerisats erfordert große Erfahrung und garantiert nicht ohne weiteres gleiche Chargen, außerdem läßt sich das Polymer nicht wieder beladen. Sinnvoller erschien es daher, einen ähnlichen Weg wie bei der Synthese des (4-Hydroxy-3-nitro)-benzylierten Polystyrols einzuschlagen.

4.1. Darstellung von polymergebundenem 1-Hydroxybenzotriazol

Fridkin und Patchornik zeigten den im Prinzip einfachsten Weg, um zu polymergebundenem 1-Hydroxybenzotriazol, im folgenden abgekürzt PHBT = Polystyrene-Bound 1-Hydroxybenzotriazole zu gelangen (33). Wie auch bei (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol wird eine Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung zum Polymer geknüpft. Es wird jedoch nicht 1-Hydroxybenzotriazol selbst, sondern das aus der monomeren Synthese bekannte o-Chlornitrobenzol als geeignetes Derivat an das Polymer gebunden. Die Herstellung der Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung erfolgte wiederum in einer Friedel-Crafts-Reaktion. Dieses polymergebundene o-Chlornitrobenzol wurde dann wie bei der Darstellung von monomerem 1-Hydroxybenzotriazol weiter umgesetzt. Man konnte durch Kochen mit Hydraziniumhydroxid in einer nukleophilen Substitution das entsprechende Arylhydrazin erhalten, das dann bei Zugabe von Salzsäure unter Wasserabspaltung den Ringschluß zum polymergebundenen 1-Hydroxybenzotriazol vollzog. Der Syntheseweg läßt sich in

der folgenden Gleichung zusammenfassen:



X = Cl, Br, OH

Unverständlicherweise verwendeten Fridkin und Patchornik aber in ihrer PHBT Synthese nicht wie bei der Synthese des (4-Hydroxy-3-nitro)-benzylierten Polystyrols das für eine Friedel-Crafts-Reaktion aufgrund der Reaktivität am besten geeignete 4-Chlor-3-nitrobenzylchlorid, sondern das entsprechende Bromid bzw. den Alkohol. Diese erfordern nämlich aufgrund ihrer stark verminderten Reaktivität bzw. auch wegen des entstehenden Wassers fast molare und noch größere Überschüsse an Aluminiumchlorid als Katalysator. Diese hohen Mengen Aluminiumchlorid geben aber Anlaß zu vielerlei Nebenreaktionen, so daß es trotz vieler Versuche nicht gelungen ist, das von Fridkin beschriebene weiße PHBT mit der entsprechenden Beladung nach der angegebenen Vorschrift zu erhalten. Es wurden stets dunkelbraune bis schwarze Produkte erhalten, die zwar den entsprechenden Stickstoffgehalt aufwiesen, sich aber nicht mit Aminosäure beladen ließen.

Wenn die Katalysatormenge bzw. die Reaktionszeit reduziert wurde, konnte man zwar relativ saubere Produkte erhalten,

diese wiesen aber nur einen geringen Stickstoffgehalt auf und ließen sich daher nur mit etwa 0.1 - 0.2 mmol Aminosäure/g beladen.

Die einzige Möglichkeit, auf dem o.a. Reaktionsweg zu PHBT zu gelangen, bot sich durch Einsatz des wesentlich reaktiveren 4-Chlor-3-nitrobenzylchlorids zur Friedel-Crafts-Alkylierung. Dieses im Hochvakuum destillierbare Produkt ließ sich leicht mittels Thionylchlorid aus dem entsprechenden Alkohol herstellen. Dieser auch im Handel erhältliche Alkohol wurde durch Reduktion der 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure mit Natriumborhydrid in Diethylenglykoldimethylether unter Zusatz von Aluminiumchlorid in einer einstufigen Synthese analog der Vorschrift von Brown und Rao (34), erhalten. Die ebenfalls möglich erscheinende Reduktion des Säurechlorids (33) mit Natriumborhydrid führte auf dem angegebenen Weg nicht zu dem gewünschten Alkohol. Eine weitere, weniger elegante Möglichkeit besteht darin, das aus 4-Chlor-3-nitrotoluol mit N-Bromsuccinimid erhältliche Benzylbromid mit Natriumcarbonat zu verseifen. Insgesamt gesehen ist die einstufige Synthese jedoch aus arbeitstechnischen Gründen und von der Ausbeute her vorzuziehen.

Auch bei Verwendung des 4-Chlor-3-nitrobenzylchlorids zur Darstellung von polymergebundenem o-Chlornitrobenzol mußte eine größere Menge an Katalysator eingesetzt werden als bei der Darstellung von (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol; jedoch genügten etwa 0.4 molare Mengen, so daß sich Nebenreaktionen in Grenzen halten. Infrarotspektren zeigen, daß die Reaktion in der gewünschten Weise stattgefunden hat (Abb. 5). Außerdem zeigte der Stickstoffwert der Elementaranalyse und die Gewichtszunahme, daß sich die Beladung in der geforderten Größenordnung von 1.8 - 2.0 mmol/g befand.

Das so erhaltene, polymergebundene o-Chlornitrobenzol ließ sich anschließend durch Kochen mit Hydraziniumhydroxid oder

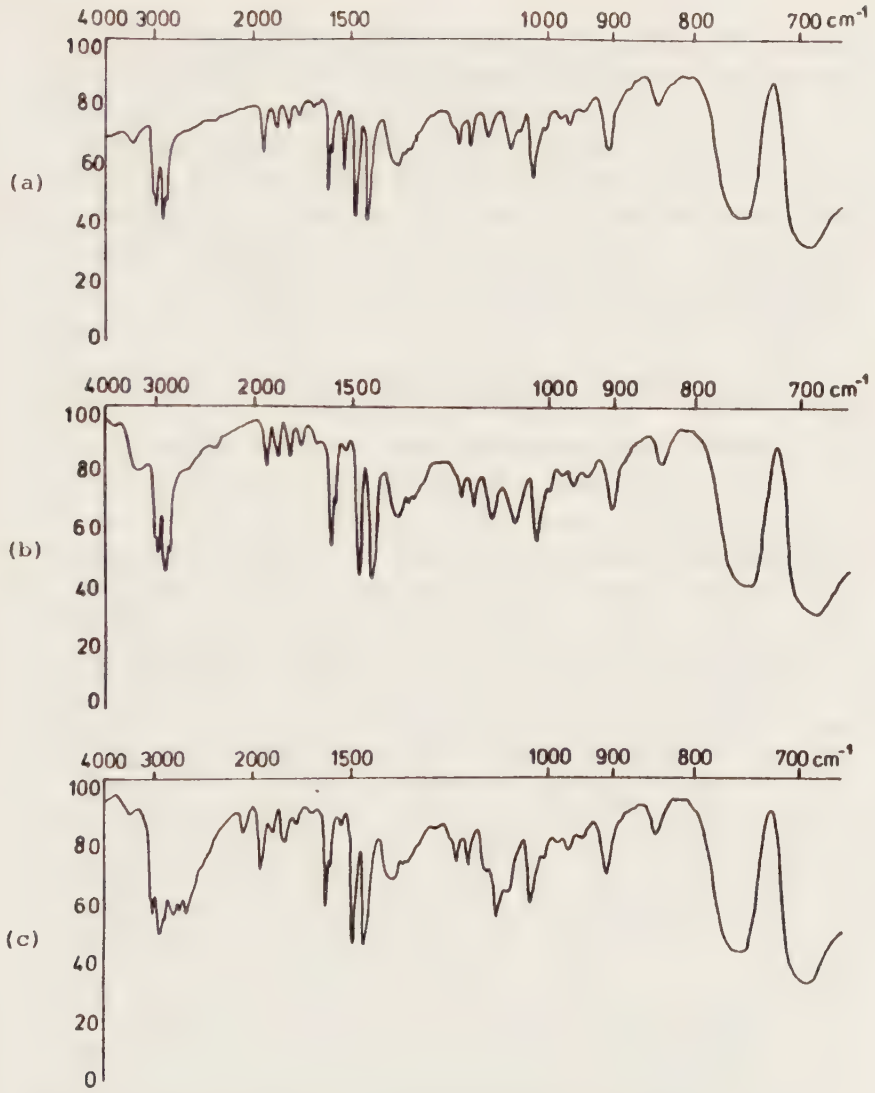


Abb. 5: IR-Spektren von polymergebundenem o-Chlornitrobenzol (a), dem Arylhydrazin (b) und polymergebundenem 1-Hydroxybenzotriazol (c) in KBr

einem Hydraziniumhydroxid/Ethylenglykolmonoethylether-Gemisch zu dem entsprechenden Arylhydrazin umsetzen. Dieses Hydrazin konnte entweder sofort durch Ansäuern mit Salzsäure unter Ringschluß zu PHBT umgesetzt werden oder aber es wurde abfiltriert, neutral gewaschen und dann mit Salzsäure oder Salzsäure/Dioxan versetzt. Wie sich herausstellte, war es nicht unbedingt notwendig, das Polymer hierzu am Rückfluß zu kochen. In allen Fällen konnte man gleichartiges PHBT von meist hellbrauner Farbe erhalten.

4.2. Beladung von polymergebundenem 1-Hydroxybenzotriazol

Die Elementaranalyse des PHBT ergab einen Stickstoffgehalt von etwa 6 mmol/g Harz, woraus auf rund 2 mmol freie OH-Gruppen/g geschlossen wurde. Die Beladung dieses Harzes mit N-geschützter Aminosäure erfolgte durch Kupplung mittels Dicyclohexylcarbodiimid in einem geeigneten Lösungsmittel, z.B. Dichlormethan. Dabei war ein 2 - 3 facher Überschuß an Aminosäure ausreichend. Sofern man nur 20 Minuten bei 0° C reagieren ließ, erhielt man Beladungen von 0.2 - 0.3 mmol Aminosäure/g, ließ man danach noch 1.5 Stunden bei Raumtemperatur stehen,. konnten in der Regel Beladungen von 1.0 - 1.3 mmol Aminosäure/g erreicht werden. Die Höhe der Beladung war auch von der verwendeten Aminosäure abhängig, so konnte man am gleichen Harz mit tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin eine Beladung von 1.3 mmol/g bei tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin nur eine Beladung von 1.0 mmol/g erzielen. Ferner war bei diesen Reaktionen zu berücksichtigen, daß am beladenen PHBT sehr leicht eine Umesterung einsetzen kann; so konnte z.B. der Dicyclohexylharnstoff nicht mit einem Methanol / Dichlormethan Gemisch ausgewaschen werden, sondern es wurde das weniger reaktive Isopropanol verwendet. Sofern der Polymeraktivester unter Feuchtigkeitsausschluß aufbewahrt wurde, ließ er sich jedoch unbedenklich einige Wochen lagern.

Die Ermittlung der Beladung erfolgte auch hier wiederum durch Abschätzung aus der Gewichtszunahme und durch Aminosäureanalyse unter auch bei (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol angewandten Bedingungen. Gewichtszunahme und Aminosäureanalyse zeigten meist gute Übereinstimmung.

4.3. Modellkupplungen

Für die Tauglichkeit des PHBT in der neu entwickelten Synthesemethode waren zwei Fragen zu klären: Bietet das PHBT tatsächlich höhere Umsätze bei kürzeren Kupplungszeiten und welche Rolle spielt die Molmasse des löslichen Trägers? Deshalb wurden einige Modellkupplungen durchgeführt, bei denen der Kupplungsverlauf beobachtet wurde.

4.3.1. Vergleich mit (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol

Um einen genauen Vergleich mit der Reaktivität von (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol zu bekommen, wurde unter gleichen Bedingungen zum einen tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin-PHBT-Ester, zum anderen durch (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertes Polystyrol aktiviertes tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin mit vergleichbarer Beladung (1.1 bzw. 1.3 mmol Aminosäure/g) mit L-Valin-polyoxyethylenester (Molmasse 6 000) umgesetzt. In Abhängigkeit von der Zeit wurde dabei der Umsatz bestimmt (Abb. 6, s. S. 31).

Aus Abbildung 6 ersieht man, daß mit polymergebundenem 1-Hydroxybenzotriazol-Aktivester innerhalb der in der Peptidsynthese üblichen Kupplungszeit gute Umsätze erzielt wurden. Typisch ist hierbei eine Kupplungszeit von einer Stunde, wobei bei dreifachem Überschuß ein Umsatz von 90 % erreicht wurde. Unter diesen Bedingungen konnte mit (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol nur 10 - 15 % Umsatz erreicht werden.

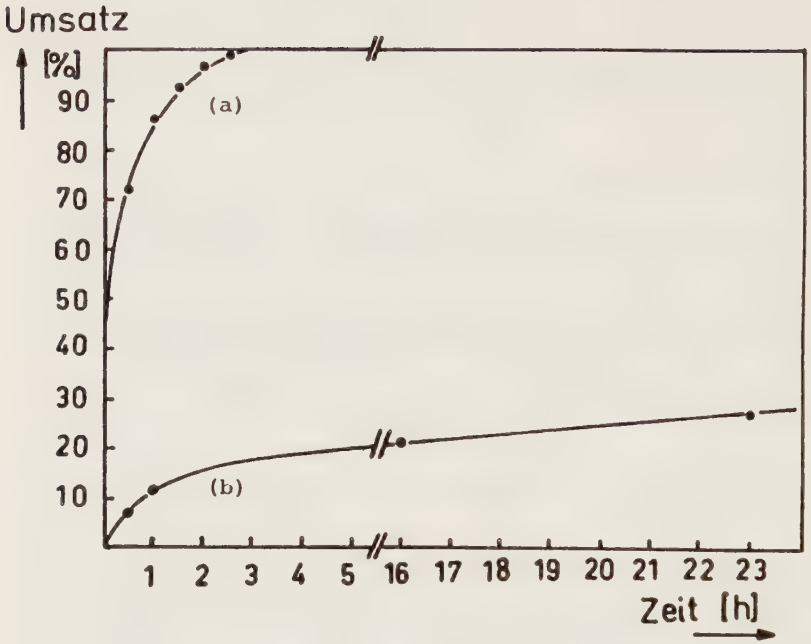


Abb. 6: Vergleich der Kupplungen von BOC-L-Ala-PHBT (a) und BOC-L-Ala-PHNB (b) mit H-L-Val-O-POE (Molmasse 6 000, Beladung 72 %) in Dichlormethan bei dreifachem Überschuß an Polymerreagens

Der Versuch wurde folgendermaßen durchgeführt: Das lösliche Polymerpeptid wurde in einer vorgegebenen Menge Dichlormethan gelöst und neutralisiert. Zu dieser Lösung wurde ein dreifacher molarer Überschuß an Polymerreagens (Konzentration der Suspension etwa 0.2 g/ml) zugesetzt und danach in bestimmten Zeitabständen eine geringe Menge Reaktionsmischung entnommen. Diese Probe wurde, um eine Weiterreaktion zu ver-

hindern, sofort in ein größeres Volumen Dichlormethan gegeben. Das mitentnommene Polymerreagens wurde abfiltriert und in die Reaktionsmischung zurückgegeben. Das Filtrat der Probe wurde eingedampft und der Rückstand in warmem Ethanol gelöst. Das Polymerpeptid wurde ausgefällt, abfiltriert und getrocknet. Zur Bestimmung des Umsatzes wurden etwa 1 -2 µmol eingewogen und unter Zusatz von Standard (9,12) mit verdünnter Natronlauge titriert. Die so erhaltenen Analysenwerte hatten eine geringe Fehlerbreite.

4.3.2. Abhängigkeit von der Molmasse des löslichen Trägers

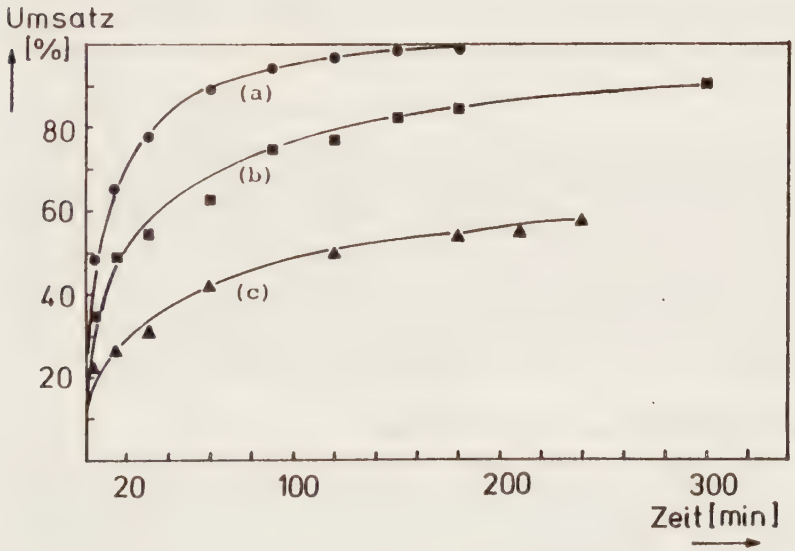


Abb. 7: Vergleich der Kupplung von BOC-L-Ala-PHBT mit H-L-Val-O-POE der Molmasse 6 000 (a), 10 000 (b) und 20 000 (c); Beladung: 52 % (a), 70 % (b), 78 % (c)

Da es sich bei der Kupplung nach dem neuen Syntheseverfahren um eine inhomogene Reaktion handelt, lag die Vermutung nahe, daß die Kettenlänge des verwendeten löslichen polymeren Trägers Einfluß auf den innerhalb einer bestimmten Zeit erreichbaren Umsatz hat. Aus diesem Grund wurde unter gleichen Reaktionsbedingungen der gleiche Polymeraktivester mit Aminosäuren umgesetzt, die an der Carboxylgruppe durch Polyoxyethylene verschiedener Kettenlänge geschützt waren. Der Polymeraktivester wurde in dreifachem Überschuß zugegeben, als Lösungsmittel diente eine stets gleiche Menge Dichlormethan. Der Umsatz wurde wie unter 4.3.1. beschrieben bestimmt. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 7 (s. S. 33).

Von den einzelnen Endprodukten wurde zusätzlich eine Aminosäureanalyse durchgeführt, deren Ergebnis einen Umsatz anzeigte, der etwa 5 % unter dem durch Titration erhaltenen Wert lag.

Wie nicht anders erwartet wurde, nahm der Umsatz mit steigender Molmasse des Trägers ab, was im wesentlichen sterische Gründe haben dürfte. Bei dreifachem Überschuß an Polymeraktivester war also nur noch Polyoxyethylen mit Molmassen unter 10 000 für diese Synthesemethode geeignet, wenn man akzeptable Umsätze erreichen wollte. Eine Verlängerung der Kupplungszeit bot sich aufgrund der Kurvenform nicht an.

4.4. Stabilität im Lösungsmittel

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen während einer Kupplung mit Polymeraktivester gaben Anlaß zu der Vermutung, daß dieser im Lösungsmittel nicht stabil sei. Deswegen wurde tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin-PHBT-Ester ohne weitere Zusätze in wasserfreiem Dichlormethan gerührt, um eine möglicherweise auftretende Zersetzung nachweisen zu können. Die in bestimmten Zeitabständen entnommenen Proben wurden zur Entfernung des Harzes durch ein Millipore Filter filtriert, das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand hydroli-

siert und im Aminosäureanalysator Alanin bestimmt (Tab. 3).

Zeit [min]	Alanin gefunden [%]
30	1.06
60	1.15
120	1.56

Tabelle 3: In Dichlormethan vom Polymeraktivester abgespaltenes Alanin

Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß innerhalb der üblichen Kupplungszeiten der Polymeraktivester so stabil ist, daß keine Verunreinigungen des Polymerpeptids zu erwarten sind.

4.5. Abschließende Betrachtungen

Für die neuentwickelte Synthesemethode ist das polymergebundene 1-Hydroxybenzotriazol, obwohl es eine aufwendigere Herstellung erfordert, den polymergebundenen Nitrophenolestern weit überlegen. Durch die problemlose Anwendung hoher Überschüsse können bei kurzen Reaktionszeiten die für eine Trägersynthese geforderten vollständigen Umsätze - unter Umständen durch etwaige Nachkupplung - erzielt werden.

Die Frage, inwieweit die Anwendung des Polymerreagens ökonomisch sinnvoll ist, muß sicher im Einzelfall entschieden werden. Sie zieht nämlich einen hohen Bedarf an geschützten Aminosäuren nach sich, denn zur Kupplung an das Polymerreagens ist ein dreifacher Überschuß an Aminosäure erforderlich. Dieser kann nicht aufgearbeitet werden, wie Versuche im Lauf dieser Arbeit gezeigt haben. Zudem wird eine verhältnismäßig große Menge an Lösungsmitteln zum Auswaschen des Harzes benötigt. Eine sinnvolle Anwendung von Polymerreagentien dürfte besonders bei den fast stets erforderlichen Nachkupplungen in der Flüssigphasenmethode gegeben sein. Sofern schon mehr

als 90 % der freien Aminogruppen reagiert haben, kann mit dem einfach abzufiltrierenden Polymerreagens der Rest gekuppelt werden. Dabei spart man sich die ansonsten anschließend erforderlichen Reinigungsschritte. Selbstverständlich beseitigt die neue Synthesemethode die prinzipiell der Flüssigphasenmethode noch anhaftenden Mängel nicht, wie etwa die immer noch mit schlechter Ausbeute erfolgende alkalische Verseifung des Polymerpeptidesters mit der sich notwendigerweise anschließenden Reinigung.

5. Experimenteller Teil

5.1.1. Darstellung der N-geschützten Aminosäuren

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin (38)

44.6 g (0.5 mol) H-L-Ala-OH werden in 800 ml Dioxan/Wasser (1:1) suspendiert und mit 78.6 g (0.55 mol) tert.-Butyloxycarbonylazid (BOC-N_3) (35-37) versetzt. Mit dem pH-Stat-Gerät gibt man bei pH 10.3 die entsprechende Menge an 4 N Natronlauge zu. Nach etwa 20 h extrahiert man zur Entfernung überschüssigen BOC-N_3 mit Ether und säuert die wäßrige Phase mit verd. Salzsäure auf pH 3 an. BOC-L-Ala-OH wird mit Essigester extrahiert, die Extrakte werden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren des Trocknungsmittels wird die Lösung eingeengt und mit Petroläther (30 - 50° C) gefällt.

Ausb. 81.3 g (86 %)
Schmp. 80 - 81° C (Lit.(38) 80 - 82° C)
$[\alpha]_{578}^{20}$ = -25.5 (c = 1 in Eisessig)
$C_8H_{15}NO_4$ (189.2)
Ber. C 50.78 H 7.99 N 7.40
Gef. C 50.71 H 8.18 N 7.49

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-valin (38)

Nach der o. a. Methode wird BOC-L-Val-OH bei pH 9.8 und einer Reaktionszeit von 20 h hergestellt. Bei der Aufarbeitung wird nach vollständigem Abziehen des Essigesters aus Ether/Petroläther (30 - 50° C) umkristallisiert.

Ausb. 73.8 g (68 %)
Schmp. 76 -78° C (Lit. (38) 72 - 73° C, (45) 77 - 79° C)
$[\alpha]_{578}^{20}$ = -6.7 (c = 1 in Eisessig)
$[\alpha]_{D}^{20}$ = -5.8 (c = 1.2 in Eisessig) (45)

$C_{10}H_{19}NO_4$ (217.3)

Ber. C 55.27 H 8.81 N 6.45

Gef. C 55.22 H 8.84 N 6.25

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin (38)

Das Derivat wird wie oben angegeben nach E.Schnabel dargestellt. Nach einer Reaktionszeit von 22 h wird wie üblich aufgearbeitet und aus Ether/Petroläther (30 - 50° C) kristallisiert.

Ausb. 98.2 g (74 %)

Schmp. 83 - 85°C (Lit. (38) 84 -86° C)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = -4.0 (c = 1 in Eisessig)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = -4.0 (c = 1 in Eisessig) (38)

$C_{14}H_{19}NO_4$ (265.3)

Ber. C 63.38 H 7.22 N 5.28

Gef. C 63.26 H 7.10 N 5.30

N-δ-Benzyloxycarbonyl-L-ornithin (40)

50.4 g (0.3 mol) H-L-Orn-OH·HCl werden in 600 ml Wasser suspendiert und bei 100° C mit $CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2$ gesättigt. Dann wird im Eisbad abgekühlt und das überschüssige Kupfercarbonat abfiltriert. Zu der blauen Lösung werden unter Rühren bei 0° C innerhalb 20 min 360 ml 2 N Natronlauge und 56.2 g (0.33 mol) Benzyloxycarbonylchlorid zugegeben. Zu dem nach 30 min abfiltrierten Kupferkomplex gibt man 250 g Titriplex III, suspendiert in 1 l Wasser und versetzt bis zur vollständigen Auflösung mit konz. Salzsäure. Man filtriert und neutralisiert unter gutem Kühlen, wobei H-L-Orn(Z)-OH ausfällt (39).

Ausb. 69.4 g (87 %)

Schmp. 258 - 260° C (Lit. (40) 253 - 255° C)

$C_{13}H_{18}N_2O_4$ (266.3)

Ber. C 58.63 H 6.81 N 10.52

Gef. C 58.60 H 6.83 N 10.58

N-α-tert.-Butyloxycarbonyl-N-δ-benzyloxycarbonyl-L-ornithin (38)

Nach der pH-Stat Methode wird H-L-Orn(Z)-OH bei pH 10.4 in 32 h mit BOC-N_3 umgesetzt und wie oben angegeben aufgearbeitet. Aus dem Öl kristallisiert BOC-L-Orn(Z)-OH durch Animpfen.

Ausb. 70.3 g (80 %)

Schmp. 95 - 97° C (Lit. (41) 94 - 96° C)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = -3.1 (c = 1 in Eisessig)

$C_{18}H_{26}N_2O_6$ (366.4)

Ber. C 59.00 H 7.15 N 7.65

Gef. C 59.04 H 7.11 N 7.69

5.1.2. Darstellung der N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-aminosäurepolyoxyethylenester

Von i. Vak. über P_2O_5 getrocknetem Polyoxyethylen und dem entsprechenden Überschuß an Aminosäurederivat werden in wasserfreiem Dichlormethan je etwa 15 proz. Lösungen hergestellt und vereinigt. Nach Zugabe der entsprechenden Menge DCCI in Dichlormethan wird bei Raumtemp. gerührt. Wird zusätzlich mit 1-Hydroxybenzotriazol aktiviert, so wird dieses in THF gelöst zugegeben. Nach der in Tab. 4 angegebenen Zeit wird der ausgefallene N,N'-Dicyclohexylharnstoff abgesaugt. Anschließend wird entweder in der gleichen Weise nachgekuppelt oder der Polymerester ausgefällt und zur Reinigung mehrmals aus wasserfreiem Ethanol/Ether umgefällt. Wenn der Polymerester dünnschichtchromato-

Tabelle 4: Darstellung der tert.-Butyloxycarbonyl-L-aminosäurepolyoxyethylenester

veresterte Aminosäure	Molmasse des POE	Kupplungs-methode	Kupplungs-zeit	Über schuß	Nachkuppl. (Überschuß)	Beladung
BOC-L-Orn(Z)-OH	10 000	DCCI	4 d	5	-	56 %
BOC-L-Ala-OH	6 000	DCCI	3 d	10	-	78 %
BOC-L-Val-OH	6 000	DCCI/HOBT	24 h	5	4 x 24 h (5-fach)	72 %
BOC-L-Val-OH	6 000	DCCI/HOBT	24 h	5	2 x 20 h (5-fach)	52 %
BOC-L-Val-OH	10 000	DCCI/HOBT	48 h	5	2 x 48 h (5-fach)	70 %
BOC-L-Val-OH	20 000	DCCI/HOBT	48 h	5	2 x 48 h (5-fach)	78 %

graphisch rein ist, wird die Beladung bestimmt. Gegebenenfalls muß nachgekuppelt werden.

Tab. 4 enthält die Reaktionsbedingungen der Veresterungen und die erzielte Beladung, die durch Titration und Aminosäureanalyse bestimmt wird.

Zur Abspaltung der BOC-Schutzgruppe wird der i. Vak. über P_2O_5 getrocknete Polymerester in 1.2 N HCl/Eisessig in 10 - 20 proz. Lösung 20 min bei Raumtemp. gerührt. Nach Verdampfen des Eisessigs wird in wenig Ethanol aufgenommen und mit Ether ausgefällt.

5.2. Darstellung von 4-Nitro-3-hydroxybenzoesäure-polystyrolester (22)

Zu einer Suspension von 62 g chlormethyliertem Polystyrol/2 % Divinylbenzol (etwa 3 - 5 % Chlor, Merck, Darmstadt) in 350 ml wasserfreiem Ethanol gibt man 49 g (267 mmol) 4-Nitro-3-hydroxybenzoesäure und 36 ml (267 mmol) Triethylamin. Nach 3 d Erhitzen am Rückfluß filtriert man ab, wäscht mit Ethanol, Wasser und Methanol so lange, bis das Filtrat farblos bleibt und trocknet dann i. Vak. über P_2O_5.

Ausb. 73 g (quantitativ)
Elementaranalyse: N 1.34
Damit enthält das Harz etwa 1 mmol Nitrophenol/g

Beladung des polymergebundenen o-Nitrophenols

20 g des Polymerreagens (1 mmol OH-Gruppen/g) werden in einer Lösung von 47.3 g (250 mmol) BOC-L-Ala-OH in 400 ml wasserfreiem Dichlormethan suspendiert. Nach Zugabe von 51.5 g (250 mmol) DCCI wird bei Raumtemp. etwa 18 h gerührt. Danach filtriert man ab und wäscht mit einer Mischung aus Dichlormethan/Methanol (1:1, v/v) den ausgefallenen

N,N'-Dicyclohexylharnstoff aus. Das Polymer wird i. Vak. über P_2O_5 getrocknet. Die Aminosäureanalyse ergibt eine Beladung von 0.4 mmol Alanin/g.

In gleicher Weisewird der Aktivester von Ornithin hergestellt. Die Reaktionszeit wird dabei jedoch auf 5 d ausgedeht.

Beladung: 0.3 mmol Ornithin/g.

5.3. Darstellung von Aktivestern mit (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertem Polystyrol

4-Hydroxy-3-nitrobenzylchlorid (42)

In eine gut gerührte Lösung von 100 g (720 mmol) o-Nitrophenol in 167 ml Formaldehydlösung (40 %), 760 ml konz. Salzsäure und 10 ml konz. Schwefelsäure leitet man bei 90 - 100° C während 6 h Chlorwasserstoff ein. Nach Abkühlen extrahiert man mit 250 ml Benzol, trocknet den Extrakt über Natriumsulfat und engt am Rotationsverdampfer ein. Nach beginnender Kristalisation gibt man 150 ml wasserfreies Ethanol zu und kühlt ab. Man erhält 40 g Rohprodukt, das aus Benzol/Petroläther (1:5) umkristallisiert wird.

Ausb. 26.6 g (20 %)
Schmp. 69 - 70° C (Lit. (42) 72 - 74° C)

(4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertes Polystyrol (26)

Zu einer Lösung von 28 g (140 mmol) 4-Hydroxy-3-nitrobenzylchlorid in 200 ml Nitrobenzol gibt man unter Rühren 46 g Copolymer aus Polystyrol/2 % Divinylbenzol und erwärmt langsam auf 65 - 70° C. Nach Erreichen dieser Temp. gibt man 14 ml einer Lösung von Aluminiumchlorid in Nitrobenzo (1.8 mol/l) zu. Die Reaktionsmischung färbt sich sofort dunkelrot und es beginnt Chlorwasserstoff zu entweichen. Man rührt etwa 3 d, bis

die Chlorwasserstoff-Entwicklung nachläßt. Nach dem Abkühlen filtriert man das Polymer ab, wäscht mit Chloroform (2 000 ml), 1 N wäßr. Salzsäure/Dioxan (3:7, v/v; 500 ml), Dioxan (300 ml) und Methanol (1 000 ml) und trocknet i. Vak. über P_2O_5.

Ausb. 67 g
Elementaranalyse: N 2.75, entsprechend einer Beladung von 1.9 - 2.0 mmol Nitrophenol/g Harz.

Beladung des (4-Hydroxy-3-nitro)-benzylierten Polystyrols

7.35 g (39 mmol) BOC-L-Ala-OH werden in wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Dazu gibt man 9.0 g (17.5 mmol freie OH-Gruppen) (4-Hydroxy-3-nitro)-benzyliertes Polystyrol und rührt 5 min bei 0° C. Nach Zugabe von 8.01 g (39 mmol) DCCI in 10 ml Dichlormethan rührt man 1 h bei 0° C und 5 h bei Raumtemp. Dann filtriert man ab und wäscht mit Dichlormethan/Methanol (1:1) den ausgefallenen N,N'-Dicyclohexylharnstoff vollständig aus. Danach wird mit Ether gewaschen und i. Vak. über P_2O_5 getrocknet.

Ausb. 10 g
Aminosäureanalyse: 0.64 mmol Alanin/g

Nach dieser Vorschrift wird das (4-Hydroxy-3-nitro)-benzylierte Polystyrol auch mit BOC-L-Orn(Z)-OH umgesetzt, wobei sich eine Beladung von 0.23 mmol Ornithin/g ergibt.

5.4. Synthese der Tripeptide

5.4.1. Allgemeine Kupplungsvorschrift

Eine 30 proz. Lösung des N-terminal freien Aminosäure-polyoxyethylenesters in Dichlormethan wird mit N-Methylmorpholin auf pH 7 - 8 gestellt. Dann gibt man das mit BOC-L-Aminosäure veresterte Polymerreagens im Überschuß

zu und versetzt mit soviel weiterem Lösungsmittel, daß gut gerührt werden kann. Man rührt bei Raumtemp., filtriert nach der vorgesehenen Reaktionszeit mittels einer Glasfritte G 3 ab, wäscht das Polymerreagens mit Dichlormethan und engt die Lösung ein. Zu der Lösung gibt man bis zur leichten Trübung vorsichtig wasserfreien Ether und kühlt durch Abziehen geringer Mengen Ether am Rotationsverdampfer ab. Dabei fällt das Polymerpeptid meistens kristallin an. Zur vollständigen Fällung gibt man noch weiteren Ether zu, läßt 30 min im Kühlschrank stehen und filtriert dann ab. Das Polymer wird auf der Fritte mit Ether gewaschen und am besten sofort aus Ethanol/Ether umkristallisiert. Dazu wird in warmem Ethanol aufgenommen und durch Zusatz von Ether wie beschrieben wieder ausgefällt. Diese Umfällung ist erfahrungsgemäß immer notwendig, ein Trocknen oder eine Reinheitskontrolle ist daher vor dieser Umfällung nicht erforderlich.

Die Dünnschichtchromatographie im System Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1) entscheidet darüber, ob nochmals umgefällt werden muß. Die Verwendung dieses Systems ist zweckmäßig, weil das Polymerpeptid am Startfleck liegenbleibt, während eventuelle Verunreinigungen wandern und somit relativ schnell erkannt werden können.

Nach Bestimmung des Umsatzes (s. Abschn. 6.7.) wird, falls erforderlich nachgekuppelt, andernfalls erfolgt die Abspaltung der Aminoschutzgruppe.

Zur Abspaltung der Aminoschutzgruppe wird das i. Vak. über P_2O_5 getrocknete Polymerpeptid in 1.2 N HCl/Eisessig gelöst (10 - 20 proz. Lösung) und 20 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird am Rotationsverdampfer rasch das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in wenig Ethanol aufgenommen. Dann wird wieder mit Ether wie beschrieben ausgefällt. Das Polymerpeptid ist jetzt einer neuen Kupplung zugänglich.

5.4.2. Abspaltung der Tripeptide vom Polyoxyethylen

Der vollgeschützte Tripeptidester wird in soviel 0.1 N Natronlauge gegeben, daß sich eine etwa 20 proz. Lösung ergibt. Unter Rühren läßt man bei Raumtemp. stehen. Nach etwa 2 h hat sich das Polymerpeptid fast vollständig aufgelöst. Man filtriert von wenig Ungelöstem ab und arbeitet die klare Lösung folgendermaßen auf:

Variante a)
Tripeptide mit einem Ornithin-Rest:
Die klare Lösung wird mit 3 N Salzsäure vorsichtig neutralisiert und dann gefriergetrocknet. Der Rückstand wird in wasserfreiem Ethanol aufgenommen, vorsichtig mit gasförmigem Chlorwasserstoff auf pH 2 gebracht und das Polyoxyethylen durch Kühlstellen der Lösung ausgefällt. Nach 10 - 15 h wird das Polyoxyethylen abfiltriert, das Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand mit dem Peptid i. Vak. über P_2O_5 getrocknet.

Variante b)
Tripeptide mit zwei und mehr Ornithin-Resten:
Die klare Lösung wird sofort mit verd. Salzsäure auf pH 2 gebracht, wobei das N-geschützte Tripeptid ausfällt. Die Suspension wird 10 min in einer Sorvall RC 2-B Kühlzentrifuge bei 5° C und 12 000/min zentrifugiert. Der feste Rückstand wird mit Wasser gewaschen, erneut zentrifugiert und dann i. Vak. über P_2O_5 getrocknet.

5.4.3. Abspaltung der Aminoschutzgruppen und Reinigung

Zur Abspaltung der Aminoschutzgruppen wird der trockene Rückstand mit wenig HBr/Eisessig übergossen. Nach 40 min wird durch Zugabe von wasserfreiem Ether das freie Peptid ausgefällt, abfiltriert, mit Ether gewaschen und i. Vak. über P_2O_5 getrocknet. Zur Entfernung von noch vorhandenen Polyoxyethylen-Spuren wird in wasserfreiem Dichlormethan

2 h gerührt, abfiltriert und erneut getrocknet. Das Peptidhydrobromid wird in wenig Wasser aufgenommen, mit 0.1 N Natronlauge neutralisiert und die Lösung auf einer Sephadex G-15-Säule (2.5 x 92 cm) mit Wasser als Elutionsmittel chromatographiert. Die im Chromatogramm (Abb. 4, s. S. 23) gekennzeichneten Fraktionen werden gefriergetrocknet und mittels Dünnschichtchromatographie und Dünnschichtelektrophorese identifiziert und auf Einheitlichkeit untersucht. Die Elektrophorese erfolgt unter folgenden Bedingungen: 300 Volt, 35 mAmp, 1 h; Elektrolyt: 1 % Ameisensäure/Essigsäure/Pyridin pH 4.2.

5.5. Darstellung von polystyrolgebundenen 1-Hydroxybenzotriazol-Aktivestern

4-Chlor-3-nitrobenzylbromid (33,43,52)

In 100 ml über P_2O_5 getrocknetem Tetrachlorkohlenstoff werden 17.1 g (0.1 mol) 4-Chlor-3-nitrotoluol gelöst und mit 17.8 g (0.1 mol) N-Bromsuccinimid und 0.2 g Benzoylperoxid versetzt. Diese Mischung wird unter Rückfluß erwärmt, bis die Reaktion anspringt. Dann wird über Nacht am Rückfluß gekocht. Nach Abkühlung auf Raumtemp. wird das entstandene Succinimid abfiltriert, der Tetrachlorkohlenstoff abdestilliert und der Rückstand i. Hochvak. destilliert.

Ausb. 10 g (40 %)

$C_7H_5NO_2BrCl$ (250.5)

Ber. C 33.53 H 2.01 N 5.59 Hal. 46.05

Gef. C 34.11 H 1.98 N 5.65 Hal. 43.20

4-Chlor-3-nitrobenzylalkohol

Analog zu der Vorschrift von H.C.Brown und B.C.Subba Rao (34) werden in einem 1 l Dreihalskolben 6.8 g (0.18 mol) Natriumborhydrid in 210 ml Diethylenglykoldimethylether gelöst und dazu unter Rühren vorsichtig eine Lösung von 36.3 g (0.18 mol)

4-Chlor-3-nitrobenzoesäure in 200 ml Diethylenglykoldimethylether getropft. Danach gibt man unter starkem Rühren 30 ml einer Aluminiumchloridlösung in Diethylenglykoldimethylether (2 mol/l) so zu, daß die Temperatur 30° C nicht überschreitet. Nach 2 h bei Raumtemp. und 30 min bei 50° C, läßt man abkühlen und gießt auf eine Mischung von 500 g Eis und 50 ml konz. Salzäure. Danach wird mit Essigester extrahiert, die Extrakte werden mit 3 x 300 ml 5 proz. Natriumcarbonatlösung, dann mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird eingeengt und das ausgefallene Rohprodukt sofort aus Ethanol unter Zusatz von Wasser umkristallisiert.

Ausb. 18.2 g (54 %)
Schmp. 61° C (Lit. (33) 48° C, (44) 63 - 64° C)
$C_7H_6NO_3Cl$ (187.6)
Ber. C 44.82 H 3.22 N 7.46 Cl 18.90
Gef. C 44.68 H 3.07 N 7.39 Cl 19.15

4-Chlor-3-nitrobenzylchlorid (44)

Unter Eiskühlung werden 18.7 g (0.1 mol) 4-Chlor-3-nitrobenzylalkohol mit 13 g (0.12 mol) frisch dest. Thionylchlorid versetzt und bis zur Beendigung der Chlorwasserstoff-Entwicklung gerührt. Nach Abdampfen des Thionylchlorids wird der Rückstand i. Hochvak. destilliert. Bei einer Badtemp. von 150° C geht eine gelbe Flüssigkeit über, die in der Kälte kristallisiert.

Ausb. 17.5 g (85 %)
Schmp. bei Raumtemp.
$C_7H_5NO_2Cl_2$ (206.0)
Ber. C 40.80 H 2.44 N 6.79 Cl 34.40
Gef. C 40.65 H 2.49 N 6.68 Cl 37.25

Polystyrolgebundenes 1-Hydroxybenzotriazol (33)

14 g i. Vak. über P_2O_5 getrocknetes Copolymer aus Polystyrol/ 1 % Divinylbenzol (Bio-Beads, S-X1, 200 - 400 mesh), 10.3 g (50 mmol) frisch dest. 4-Chlor-3-nitrobenzylchlorid, sowie 2.5 g (19 mmol) Aluminiumchlorid werden in 150 ml Nitrobenzol langsam auf 65° C erwärmt und 48 h gerührt. Danach läßt man abkühlen und saugt das Polymer auf einer Glasfritte G 3 ab. Anschließend wäscht man mit einer 50 proz. Lösung von 1 N wäßr. Salzsäure in Dioxan (3 x 200 ml), Methanol (3 x 200 ml), Dimethylformamid (3 x 200 ml) und Dichlormethan (3 x 200 ml). Zum Schluß wird i. Vak. über P_2O_5 getrocknet.

Elementaranalyse: N 2.84, entspr. 2.0 mmol/g Beladung

Das getrocknete Harz wird in einer Mischung aus Hydraziniumhydroxid/Ethylenglykolmonoethylether (4:6, v/v) 20 h am Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen saugt man ab und wäscht solange mit Wasser, bis das Filtrat neutral reagiert. Eine Probe wird getrocknet und analysiert.

Elementaranalyse: N 11.86, entspr. 2.8 mmol/g Beladung

Die Hauptmenge des Harzes wird ohne Trocknung in einer Mischung aus konz. wäßr. Salzsäure/Dioxan (1:1, v/v, 200 ml) suspendiert und 20 h am Rückfluß gekocht. Das Harz wird nach Abkühlen abfiltriert, sorgfältig mit Wasser (5 x 200 ml), Methanol (3 x 200 ml) und Ether (2 x 200 ml) gewaschen und i. Vak. über P_2O_5 getrocknet.
Ausb. 18 g
Elementaranalyse: N 8.25 Cl 1.17
Damit ergibt sich aus der Gewichtszunahme und der Elementaranalyse übereinstimmend eine Beladung von 2 mmol HOBT/g. Der Chlorgehalt beträgt nur noch 0.3 mmol/g.

Beladung mit Aminosäurederivaten

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin-polystyrolgebundener-1-hydroxybenzotriazol-ester

1.8 g (10 mmol) BOC-L-Ala-OH in 20 ml wasserfreiem Dichlormethan werden bei 0° C mit 2 g PHBT (2 mmol freie OH-Gruppen/g) für 5 min gerührt. Dann gibt man 2.06 g (10 mmol) DCCI in etwas Dichlormethan gelöst zu und rührt weitere 20 min bei 0° C. Anschließend wird bei Raumtemp. noch 1.5 h gerührt, danach das Polymer abfiltriert und mit Chloroform/2-Propanol (4 x 50 ml, 1:1, v/v)gewaschen um den ausgefallenen N,N'-Dicyclohexylharnstoff zu entfernen. Dann wird noch mit 50 ml Ether gewaschen und i. Vak. über P_2O_5 getrocknet.

Ausb. 2.4 g
Aminosäureanalyse: 1.2 mmol Alanin/g.

Die Aktivester von N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-valin und N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin werden nach derselben Vorschrift hergestellt, wobei sich ähnliche Beladungen ergeben.

5.6. Synthesen mit Polystyrolgebundenen 1-Hydroxybenzotriazol-Aktivestern

Bestimmung des Umsatzes in Abhängigkeit von der Zeit bei der Kupplung von BOC-L-Ala-PHBT an H-L-Val-O-$POE_{6\ 000}$

Eine Lösung von 1.9 g (0.5 mmol) $^{+}H_2$-L-Val-O-POE·Cl^{-} (Beladung 77 %, Molmasse 6 000) in 10 ml wasserfreiem Dichlormethan wird mit N-Methylmorpholin auf pH 7 - 8 gestellt. Dazu gibt man unter leichtem Rühren 1.8 g (1.5 mmol) BOC-L-Ala-PHBT (Beladung 0.8 mmol Alanin/g). Aus dieser Mischung werden in bestimmten Zeitabständen etwa 300 µl Proben entnommen und sofort mit 10 ml wasserfreiem Dichlormethan verdünnt und filtriert. Das PHBT wird zurückgegeben,

die klare Lösung am Rotationsverdampfer eingeengt und das Polymerpeptid mit Ether ausgefällt, 30 min kühl gestellt und abfiltriert. Der Rückstand wird sofort in Ethanol aufgenommen und erneut ausgefällt, um das ebenfalls titrierbare N-Methylmorpholin zu entfernen. Die Proben des Polymerpeptids werden getrocknet und dann titriert.

Nach der eben beschriebenen Methode wird auch die Bestimmung des Umsatzes bei allen anderen Kupplungen vorgenommen, wobei Unterschiede in der Beladung allerdings zu verschiedenen Einwaagen zwingen. Die übrigen Bedingungen sind dieselben.

5.7. Durchführung der Analysen

5.7.1. Potentiometrische Titration

Zur Bestimmung des Umsatzes werden etwa 2 - 3 µmol gut getrocknetes Polymerpeptid eingewogen und in 1 ml Standard gelöst (1 µmol Glycinethylester/ml). Dann wird mit einer Mikroeinstabglaselektrode am Metrohm Dosimat mit 5×10^{-3} N Natronlauge titriert. Von der Gesamtmenge titrierter Aminogruppen wird der Standardwert abgezogen, der Rest ist nicht umgesetztes Polymerpeptid. Durch Umrechnung auf die Gesamteinwaage ergibt sich der Umsatz in Prozent. Die Zugabe von Standard erfolgt, weil Mengen unter 1 µmol nicht mehr genügend genau titrierbar sind (12).

5.7.2. Aminosäureanalyse

Für die Aminosäureanalyse wird etwa 2 - 3 µmol Substanz eingewogen. In zugeschmolzenen Ampullen mit 6 N Salzsäure bei 110° C wird 24 h hydrolisiert.

Zur Analyse der Polymerreagentien wird die gleiche Menge in 1 ml 4 N Natronlauge/Methanol (1:1, v/v) etwa 20 min bei 40° C in stabilen Schraubgläschen verseift, dann mit genü-

gend 6 N Salzsäure versetzt und 1 h bei 110° C hydrolisiert.

Nach Abziehen der Salzsäure wird auf einem Beckmann Multichrom die Aminosäureanalyse durchgeführt.

IV. Verwendung von ß-Nitrostyrol als Schwefelschutzgruppe und Untersuchungen zur Konfiguration einiger Addukte

1. Die Bedeutung von Cystein in Peptiden und Proteinen

Erst etwa 100 Jahre nach der Entdeckung des Cystins durch Wollaston (46) wurde dessen Struktur aufgeklärt (47,48), und kurz danach wurde mit dem Auffinden von Thiolgruppen in Proteinen auch das Cystein entdeckt (49). Aber erst die Entdeckung des Glutathions durch Hopkins im Jahre 1921 (50) gab Anlaß, die Rolle der Thiolgruppe in Peptiden und Proteinen näher zu untersuchen.

Seither sind in einer großen Zahl von Veröffentlichungen ausführliche Daten über die Funktion der Thiolgruppe in physiologischen und biochemischen Prozessen bekannt geworden. So ist die Thiolgruppe ein wesentlicher Faktor bei der Nervenleitung, Muskelkontraktion, Zellteilung, bei Membranprozessen, der Photosynthese und der oxidativen Phosphorylierung. Ebenso wichtig ist die Rolle der Thiolgruppe bei Schutz vor Strahlung und bei der Entgiftung (51). Das Cystein übernimmt in Enzymen katalytische Funktionen (z.B. Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase), die Bindung von Metallionen und Coenzymen und trägt, oxidiert zum Cystin, über Disulfidbrücken zur Erhaltung der Konformation bei. Der Einfluß von Thiolreagentien auf diese Prozesse ist in einer Blockierung der Thiolgruppe der entsprechenden Enzyme oder Proteine bzw. der niedermolekularen Thiole zu suchen.

Obwohl es viele andere Aminosäuren mit Drittfunktionen gibt, die ausgeprägt an enzymatischen Prozessen beteiligt sind, hat das Interesse an der Thiolgruppe nicht nachgelassen, da sich diese durch ihre hohe Reaktivität und die vielfachen Möglichkeiten an chemischen Reaktionen, wie Alkylierung, Acylierung, Oxidation, Thiol-Disulfid Austausch und möglicherweise durch Bildung von Charge-Transfer Komplexen auszeichnet.

2. Peptidsynthesen mit Cystein

Aufgrund der großen physiologischen Bedeutung des Cysteins bzw. des Cystins in Peptiden und Proteinen, wurde schon frühzeitig begonnen, Synthesen mit dieser Aminosäure durchzuführen (53 - 56). Grundsätzlich bieten sich hier zwei Wege an (57):

1. Das Cystein-Verfahren, wobei mit oder ohne Schwefelschutzgruppe gearbeitet werden kann.

2. Das Cystin-Verfahren, unter Verwendung symmetrisch oder asymmetrisch substituierter Cystin-Derivate.

Das Cystein-Verfahren und seine Möglichkeiten wird im folgenden kurz erläutert.

Nach Harington und Mead (58) ist es zwar unter sorgfältigem Ausschluß von Luftsauerstoff durchaus möglich, Cysteinpeptide ohne Schutz der Thiolgruppe zu synthetisieren, die hohe Nukleophilie der Thiolgruppe legt jedoch einen Schutz während der Synthese nahe. Der Einsatz von S-unmaskierten Derivaten wird äußerst seltenen Spezialfällen vorbehalten sein.

Für Synthesen mit geschützter Thiolfunktion sind bisher S-Alkylierung, Thioacetalbildung, S-Acylierung und die Herstellung von asymmetrischen Disulfidgruppierungen (z.B. S-Alkylthio-Derivate) herangezogen worden.

Beispielhaft und bahnbrechend ist die Synthese von S-Benzyl-Derivaten des Cysteins durch du Vigneaud (59 - 61) gewesen, deren Einsatz in der Synthese lange Zeit ohne Konkurrenz gewesen ist. Lediglich die Abspaltung der S-Benzyl-Gruppe stellt keine befriedigende Lösung dar, da die Spaltung mit Natrium in flüssigem Ammoniak nicht immer ohne Komplikationen verläuft und die Spaltung mit Fluorwasserstoff nicht ganz ohne Nebenreaktionen abgeht (62). Bei Versuchen zur Synthese von Insulin sind jedoch die Grenzen dieser Schutz-

gruppe endgültig erreicht worden. Als Folge der Schutzgruppenabspaltung hat u.a. Katsoyannis (63) eine teilweise Entschwefelung des Cysteins feststellen können.

Weil die S-Benzyl Maskierung nicht voll zufrieden stellen kann, sind eine große Zahl von Thiolschutzgruppen entwickelt worden, von denen wohl die bekanntesten die Trityl- (64, 65), die Ethylcarbamoyl- (66), die Ethylmercapto- (67), die 4-Methoxybenzyl- (68) und die Benzylthiomethyl-Gruppe (69) sind.

Eine ausführliche Zusammenstellung aller bisher bekannten Schwefelschutzgruppen findet sich bei E.Wünsch (57).

2.1. Addition von ß-Nitrostyrol als Thiolschutz

Die hohe Nukleophilie der Thiolgruppe schon bei niedrigem pH ermöglicht es, daß die meisten Reagentien schneller mit der Thiolgruppe reagieren als etwa mit der freien Aminogruppe einer Aminosäure. So ist die Reaktivität eines Thiolats gegenüber einer α,β-ungesättigten Verbindung wie etwa Acrylnitril 280 mal höher als die von nicht protonierten Aminogruppen (70) und noch wesentlich höher als die einer Hydroxylgruppe. Zurückzuführen ist die hohe Nukleophilie des Thiolats auf die Elektronenstruktur des Schwefels und dessen hohe Polarisierbarkeit.

Wie bereits erwähnt, können Thiole an Verbindungen mit polarisierten oder leicht polarisierbaren Doppelbindungen addiert werden, etwa an Acrylnitril, Acrolein, Maleinsäure und ähnliche. Diese Additionen erfolgen in der Regel unter Basenkatalyse und verlaufen glatt mit guter Ausbeute.

Es sind bereits früher erfolgreich Thiole an Nitroolefine unter milden Bedingungen addiert worden (71 - 74). Bereits bei Zimmertemperatur wird dabei das entsprechende Sulfid gebildet, während die Addition eines Alkohols selbst bei erhöhter Temperatur nur Spuren des entsprechenden Ethers lie-

fert (72). Auch an ß-Nitrostyrol erfolgt die Addition von Thiolen wesentlich leichter als die von Aminen und Alkoholen, die schon länger bekannt ist (75 - 77).

Die erste Addition von Cystein an ß-Nitrostyrol wurde von R.T.Louis-Ferdinand und G.C.Fuller (78) durchgeführt. Im Rahmen von UV Messungen stellten sie eine "Wechselwirkung" fest, zogen daraus aber nicht den logischen Schluß, daß es sich hierbei um eine Additionsreaktion handelt. Als Thiolreagens mit hoher UV Absorption verwendeten Masri, Windel und Friedman im Jahre 1972 4-Nitrostyrol, wobei sie Cystein und Glutathion addierten und gleichzeitig von der großen Stabilität der entstandenen S-Alkylprodukte im sauren Bereich berichteten (79).

Auf ihre Anwendbarkeit als Schutzgruppe sind ß-Nitrostyrole bisher noch nicht untersucht worden. Die leichte Zugänglichkeit der Additionsprodukte aus ß-Nitrostyrolen und Cystein-Derivaten und deren Stabilität unter acidolytischen Abspaltungsbedingungen für Aminoschutzgruppen lassen jedoch ß-Nitrostyrol als Schwefelschutzgruppe bei Peptidsynthesen durchaus geeignet erscheinen. Die Abspaltung der Schutzgruppe kann unter milden alkalischen Bedingungen erfolgen, wobei u. a. Esterbindungen erhalten bleiben können. Über die Einführung der Schutzgruppe, Charakterisierung der Additionsprodukte mit Cystein-Derivaten, sowie die Abspaltungsbedingungen wird im folgenden berichtet.

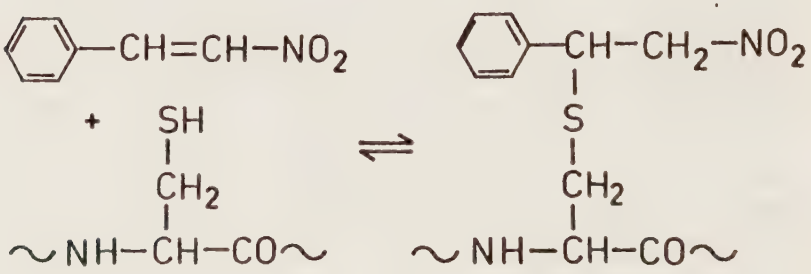
2.1.1. Synthese von ß-Nitrostyrolen

Die Synthese von ß-Nitrostyrolen erfolgt am einfachsten aus entsprechend substituierten Benzaldehyden und Nitromethan in einer Aldolreaktion (80), wobei unter Zusatz von Alkali zuerst der Alkohol entsteht, der durch Zugabe von starker Säure dehydratisiert wird.

Viele ß-Nitrostyrole können auch unter Zugabe von organischen Basen als Katalysator direkt aus Aldehyd und Nitromethan durch mehrtägiges Stehenlassen im Dunkeln erhalten werden. Unter Wasserabspaltung lassen sich je nach verwendeter Base unterschiedliche Produkte in guter Ausbeute kristallin erhalten (81). Eine weitere Möglichkeit zur Synthese von substituierten ß-Nitrostyrolen findet sich bei Raiford, Chas und Fox, die den entsprechenden Aldehyd mit Nitromethan unter Zugabe von Ammoniumacetat in Eisessig umsetzen (82). Weitere Synthesen von ß-Nitrostyrolen finden sich in der Literatur (83 - 90), vor allem auch in Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller) (91).

2.1.2. Synthese von Cystein und Glutathion Addukten

Die Thiolgruppe von Glutathion, Cystein und dessen Derivaten kann nach eigenen Untersuchungen unter milder Basenkatalyse an die Doppelbindung von ß-Nitrostyrolen nach folgender Gleichung addiert und wieder eliminiert werden:



Die entstehenden Addukte sind gegenüber den in der Peptidchemie zur Abspaltung von N-tert.-Butyloxycarbonyl-, N-Benzyloxycarbonyl- sowie der O-tert.-Butyl-Gruppe verwendeten Säuren (Trifluoressigsäure, Chlorwasserstoff in Eisessig und Bromwasserstoff in Eisessig) völlig stabil. Auch unter den energischen Hydrolysebedingungen der Peptidhydrolyse (6 N Salzsäure bei 110° C) läßt sich die

2-Nitro-1-phenylethyl-Gruppe (NPE-Gruppe) nur teilweise abspalten.

Ein für die Peptidsynthese brauchbares Derivat wurde durch Umsetzung von N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein mit ß-Nitrostyrol erhalten (92). Aufgrund der Alkalilabilität der 2-Nitro-1-phenylethyl-Schutzgruppe mußte der Schutz der Aminogruppe vorher erfolgen, da diese Reaktion in alkalischem Medium erfolgt.

Sofern bei der Umsetzung in Ethanol als Lösungsmittel und mit N-Methylmorpholin als Base gearbeitet wurde, fiel das N-Methylmorpholiniumsalz der N- und S-geschützten Aminosäure nach wenigen Minuten feinkristallin aus und konnte leicht isoliert werden. Dieses Salz wurde direkt zur Synthese verwendet, es ließ sich aber auch die freie Säure durch Ansäuern und Extrahieren nach üblichen Methoden erhalten. Obwohl bereits nach kurzer Zeit im Reaktionsgemisch keine freien Thiolgruppen mehr nachweisbar waren, erhielt man nur etwa 70 % kristallines Produkt. Bei dieser Addition eines chiralen Substrats an ein Prochiralitätszentrum entstehen zwei verschieden gut kristallisierende Diastereomere, und der Hauptanteil des schlechter kristallisierenden bleibt noch im Lösungsmittel zurück. Auf eine Anwendung dieses stereochemischen Sachverhalts wird in Abschn. 2.3. näher eingegangen.

Sieht man von der etwas aufwendigen Darstellung von N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein aus Cystin durch Umsetzung mit tert.-Butyloxycarbonylazid und nachfolgender Spaltung mit Natrium in flüssigem Ammoniak ab, ist die Synthese des N- und S-geschützten Cysteins zu N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-L-cystein schnell und problemlos durchzuführen. Diese Reaktions- und Aufarbeitungsbedingungen konnten aber nicht auf Additionsreaktionen mit substituiertem ß-Nitrostyrol ohne Modifikation übertragen werden. So bildete

sich bei der Reaktion mit 3,4-Dimethoxy-ß-nitrostyrol unerwartet kein schwerlösliches N-Methylmorpholiniumsalz, so daß hier eine andere Aufarbeitung herangezogen werden mußte.

Das Additionsprodukt aus der freien Aminosäure Cystein und ß-Nitrostyrol ließ sich wieder in sehr einfacher Weise in einer Mischung aus Methanol und Wasser mit Triethylamin als Base herstellen, wobei jeweils äquimolare Mengen eingesetzt wurden. Das schwerlösliche Produkt kristallisierte aus der Lösung nach kurzer Zeit direkt oder beim Einengen aus.

In ähnlicher Weise konnte Glutathion mit ß-Nitrostyrol umgesetzt werden, wobei als Base ebenfalls Triethylamin Verwendung fand. Bereits nach kurzer Zeit fiel die Nitroprussidnatrium-Reaktion negativ aus, zudem ließ sich eine Entfärbund der bisher gelben Lösung beobachten. Nach Einengen der Lösung kristallisierte das Addukt bei Zugabe der äquimolaren Menge Salzsäure aus. Die Ausbeute betrug etwa 50 % das bedeutet, daß auch hier ein schlechter kristallisierendes Diastereomeres zurückblieb, das jedoch ebenfalls isoliert werden konnte.

Der Versuch, nach der obigen Methode ein kristallines Addukt aus Glutathion und 3,4-Dimethoxy-ß-nitrostyrol zu erhalten, scheiterte. Nach dem Ansäuern ließ sich nur ein stark verunreinigtes Produkt erhalten, das auch durch präparative Gelchromatographie nicht gereinigt werden konnte.

Die Darstellung der N-Acetyl-D-cystein-Addukte wurde in bereits beschriebener Weise (93) vorgenommen.

Bereits früher wurden von O.Schales (88) ß-Nitrostyrole allein auf ihre Hemmwirkung in mikrobiologischen Tests geprüft. Deshalb wurden auch die Additionsprodukte aus ß-Nitrostyrol und Glutathion auf ihre Hemmwirkung gegen Escherichia coli K 12 in einem mikrobiologischen Testsystem untersucht. Als Testanordnung wurde ein Verdünnungsreihen-Test gewählt bei einer Flüssigkeitskultur mit 10^6 Zellen/ml

Medium. Dabei ergab sich eine minimale Hemmkonzentration von 1 - 5 x 10^{-6} mol/l (94).

2.1.3. Synthese eines 2-Nitro-1-phenylethyl-geschützten Tripeptids

In Versuchen an Escherichia coli hat Ch.Gilvarg gezeigt (95), daß Di-, Tri- und Tetrapeptide als Aminosäurequelle dienen können. Diese werden offenbar durch wenig spezifische Peptidpermeasen in das Zellinnere von Bakterien transportiert und dort von Peptidasen in die einzelnen Aminosäuren zerlegt. Wichtig für die Funktion dieser Peptidpermeasen ist nach den Experimenten von Gilvarg nur das Vorhandensein einer freien, unblockierten Aminogruppe, während die Seitenkettenfunktionen der einzelnen, das Peptid aufbauenden Aminosäuren dabei unwesentlich ist.

Bestätigt werden Gilvargs Ergebnisse durch eine Arbeit von A.Eisele (120) über das Tripeptid L-Arginyl-D-allo-threonyl-L-phenylalanin (121), das aus "Keratinophyton terreum" isoliert werden kann. Hier beruht die antibiotische Wirkung eindeutig darauf, daß das Tripeptid nach seinem Transport in das Zellinnere gespalten wird, und das mittelständige als kompetitiver Inhibitor des L-Threonins wirkende D-allo-Threonin freigesetzt wird.

Auch das aus Streptomyces Arten isolierte Phosphinotricyl-alanyl-alanin dürfte nach diesem Mechanismus seine antibiotische Wirkung entfalten (96,97). Diese experimentellen Befunde legten es nahe, synthetische, antibiotisch wirksame Substanzen durch Einbau in kürzere Peptide in eine transportfähige Form zu bringen.

Aus diesem Grund wurde das Tripeptid S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-cysteinyl-alanyl-alanin hergestellt, um möglicherweise eine Steigerung der Hemmwirkung durch verbesserte Aufnahme in das Zellinnere zu erzielen. Die Synthese des Tripeptids

wurde nach dem Schema in Abbildung 8 durchgeführt. Da eine alkalische Esterabspaltung am Ende der Synthese wegen des verwendeten alkalilabilen ß-Nitrostyrol-Restes nicht möglich war, mußte der tert.-Butylester eingesetzt werden. Die Verwendung dieses Esters erforderte wiederum einen Schutz der Aminogruppe des Alanins mit der Benzyloxycarbonyl-Gruppe, die hydrogenolytisch abgespalten wurde. Die Kupplung zum Tripeptid erfolgte unter Verwendung von N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-L-cystein N-Methylmorpholiniumsalz mit 1-Hydroxybenzotriazol und Dicyclohexylcarbodiimid. Die Abspaltung der N- und O-Schutzgruppe wurde durch 130 minütige Behandlung mit Chlorwasserstoff in Eisessig vorgenommen. Hierbei blieb die neue Schwefelschutzgruppe vollständig erhalten. Das Tripeptid Hydrochlorid konnte danach in kristalliner Form erhalten werden.

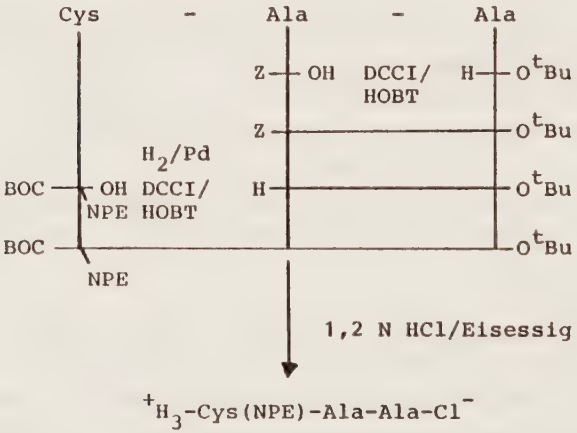


Abb. 8: Syntheseschema zur Synthese von S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-cysteinyl-alanyl-alanin

Das Tripeptid wurde im bereits erwähnten System von Escherichia Coli K 12 getestet. Auch hier ergab sich eine minimale Hemmkonzentration bei 1 - 5 x 10^{-6} mol/l; die erwartete Steigerung wurde also nicht erreicht. Zum Strukturbeweis der

synthetisierten Verbindungen wurden die einzelnen Synthesestufen auch NMR-spektroskopisch untersucht. Das ^{13}C-PFT-NMR-Spektrum des vollgeschützten Tripeptids und die Zuordnung der Signale zeigt die Abbildung 9 (s. S. 62).

2.1.4. Abspaltung des 2-Nitro-1-phenylethyl-Restes

In Verbindungen mit elektronenanziehenden Gruppen ist sowohl die Additionsfreudigkeit als auch die Eliminierbarkeit aus einem Addukt infolge Proton-Entzuges stark ausgeprägt. Aus diesem Grunde sollte die Addition von ß-Nitrostyrol an Cystein-Derivate reversibel sein, wenn durch Einwirkung von Basen eine ß-Eliminierung eintritt (vgl. Lit. 98).

Zur Untersuchung der Abspaltungsbedingungen wurden Addukte aus ß-Nitrostyrol und Glutathion bzw. N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein bei Raumtemperatur mit verschiedenen Basen behandelt. Das entstandene Produktgemisch wurde durch Dünnschichtchromatographie in den Systemen Chloroform/Methanol (1:1), Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1) und Chloroform/Methanol/17 % Ammoniak (70:35:10) getrennt und anschließend identifiziert. Als besonders günstig erwies sich das basische System. Als Thiolreagens wurde eine ammoniakalische Lösung von Nitroprussidnatrium verwendet. Teilweise wurde auch Stickstoff als Schutzgas eingesetzt.

Bei Einwirkung von 2 N Natriumhydroxid in wasserfreiem Ethanol ließ sich schon nach wenigen Minuten eine intensive Gelbfärbung der Lösung beobachten, was auf eine Abspaltung des Nitrostyrol-Restes deutete. Bei Besprühen mit Thiolreagens trat eine Rotfärbung auf, die Lösung enthielt also freie Thiolgruppen. Erwartungsgemäß nahm bei Erniedrigung der Alkalikonzentration unter sonst identischen Bedingungen die Abspaltungsdauer zu. Immerhin war aber mit 0.5 N Natriumhydroxid in wasserfreiem Ethanol eine quantitative Abspaltung innerhalb 30 - 60 Minuten möglich.

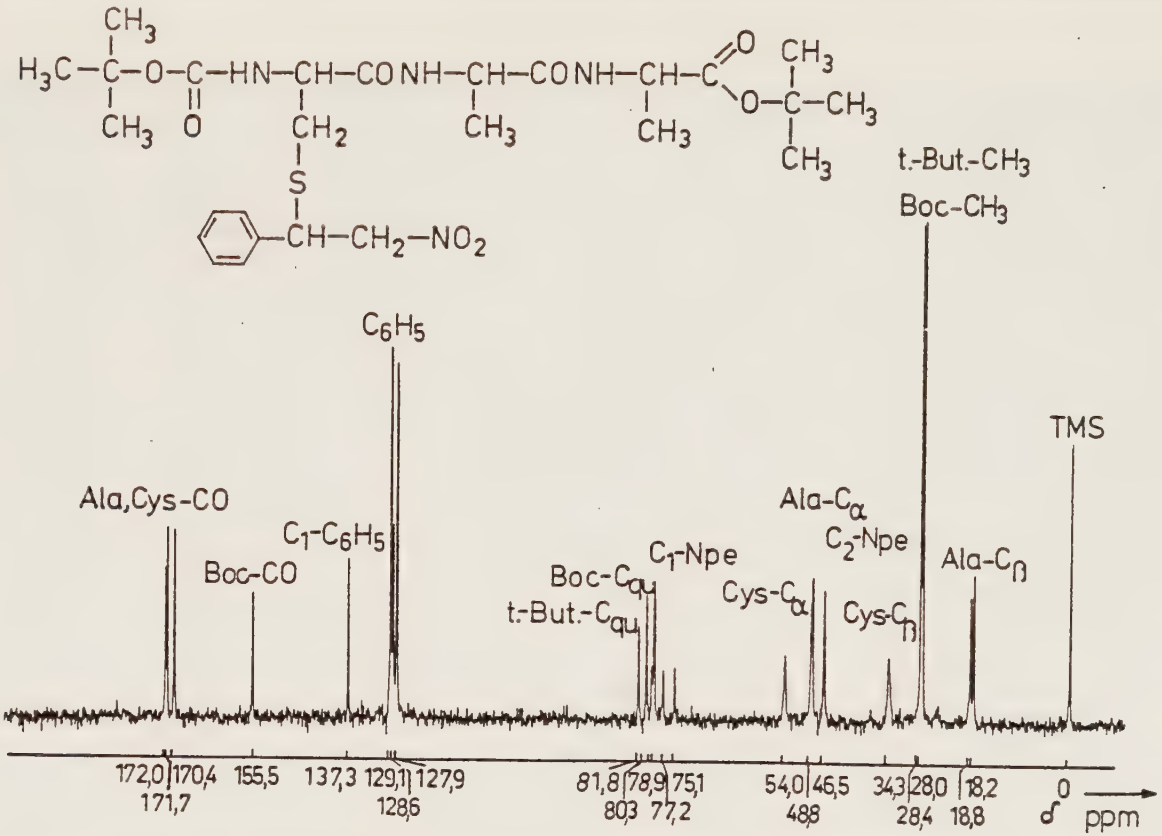


Abb. 9: ^{13}C-PFT-NMR-Spektrum (22.63 MHz) von N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-L-cysteinyl-alanyl-alanin-tert.-butylester in $CDCl_3$

Bei präparativen Ansätzen wurde nach 30-minütigem Einwirken von 1 N Natriumhydroxid in wasserfreiem Ethanol auf das Glutathion-Addukt in 60 prozentiger Ausbeute Glutathion als Quecksilbersalz erhalten. Wenn zu der Suspension des Glutathion-Addukts in der ethanolischen Lauge nach 5 Minuten etwa 25 % Wasser zugesetzt wurde, was zu einer sofortigen Auflösung des Addukts führte, konnten 66 % Glutathion als Quecksilbersalz erhalten werden. Die Verwendung von 1 N Natriumhydroxid in Ethanol/Wasser (7:3) als Abspaltungsreagens ergab 64 % Quecksilbersalz. Das Glutathion-Quecksilbersalz wurde anschließend mit Schwefelwasserstoff in üblicher Weise zerlegt, die wäßrige Lösung gefriergetrocknet und das weiße Produkt anschließend mit Glutathion als Referenz mittels Dünnschichtchromatographie identifiziert.

Außer mit ethanolischer Natriumhydroxid-Lösung wurde eine Abspaltung des ß-Nitrostyrol-Restes auch mit Ammoniak/Chloroform durchgeführt. Bei Raumtemperatur mit Ammoniak gesättigtes Chloroform konnte bereits nach 3 - 4 Minuten soviel Cystein-Derivat freisetzen, daß auf der Dünnschichtplatte mit Nitroprussidnatrium eine Färbung auftrat. Das gleiche Ergebnis ließ sich auch mit verdünnter wäßriger Ammoniaklösung erreichen. Eine Anwendung stark ammoniakalischer Laufmittel bei der Dünnschichtchromatographie von Addukten scheidet daher aus. Tatsächlich konnte dabei bereits während üblicher Laufzeiten eine Abspaltung des ß-Nitrostyrol-Restes beobachtet werden, wie positiv ausfallende Nitroprussidnatrium-Reaktionen bewiesen. Selbstverständlich sind demnach auch Abspaltungen unter Ammonolysebedingungen möglich, z.B. in Ammoniak/Alkohol-Gemischen, in Ammoniak/Dimethylformamid, in flüssigem Ammoniak. Vorversuche haben gezeigt, daß der NPE-Schutz auch unter den zur Entfernung des S-Benzyl-Restes angewendeten Bedingungen, nämlich Natrium in flüssigem Ammoniak, abgespalten wird.

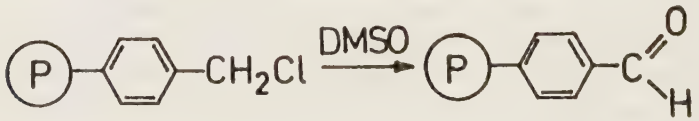
2.2. Synthese von polymergebundenen ß-Nitrostyrolen

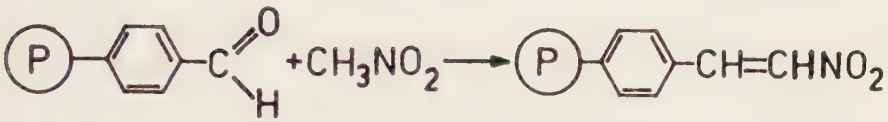
Die Synthese verschiedener polymergebundener ß-Nitrostyrole ist aus mehreren Gründen interessant. Zum einen können an dieses Polymer aus einem Peptidgemisch Peptide mit Thiolgruppen addiert werden und so leicht selektiv entfernt werden. Eine anschließende Freisetzung der Peptide ist möglich. Zum anderen kann je nach Art des polymeren Trägers eine starke Beeinflussung der Löslichkeit des addierten Cysteinpeptids eintreten. So kann unter anderem eine löslichmachende Schwefelschutzgruppe synthetisiert werden. Außerdem können unlösliche oder lösliche Polymere als Träger für eine Synthese von Cystein enthaltenden Peptiden dienen, wobei in beiden Richtungen, also N- oder C-terminal gekuppelt werden könnte, wie dies auch von R.Walter vorgeschlagen wird (99).

Zur Synthese polymergebundener ß-Nitrostyrole stehen prinzipiell zwei Wege zur Verfügung. Einmal kann das ß-Nitrostyrol aus Nitromethan und polymergebundenem Aldehyd aufgebaut werden, zum anderen läßt sich ß-Nitrostyrol, das entsprechend substituiert ist, an Polymere anknüpfen.

2.2.1. Synthese von ß-Nitrostyrol an einer Polystyrolmatrix

Wie sich bei Versuchen mit Aktivestern schon gezeigt hat, ist eine Esterbindung zum Polystyrolträger nicht ausreichend stabil, so daß eine Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung anzustreben ist. Deswegen wurde die Synthese des ß-Nitrostyrols aus einem Polystyrolharz mit Aldehydfunktion und Nitromethan nach folgender Gleichung durchgeführt:





Die Einführung der Aldehydfunktion wurde nach Frechet und Schuerch (100) durch Oxidation eines chlormethylierten Polystyrols (Merrifield-Harz) mit Dimethylsulfoxid vorgenommen. Das Infrarot-Spektrum des Reaktionsproduktes zeigt deutlich eine Carbonylbande bei 1 690 cm^{-1} (Abb. 10, s. S. 66). Die Umsetzung mit Nitromethan wurde unter Zusatz von n-Butylamin in Pyridin durchgeführt. Hier ist ebenfalls im Infrarotspektrum (Abb. 10, s. S. 66) eine Umsetzung zu erkennen. Zudem ergab die Elementaranalyse einen Stickstoffgehalt von 0.9 mmol/g Harz, was vollständigen Umsatz bedeutet.

An dieses Polymer konnte unter Basenkatalyse N-Acetyl-L-cystein in ethanolischer Lösung addiert werden. Zur Erzielung einer vollständigen Beladung wurde ein fünffacher Überschuß an Aminosäure eingesetzt. Der Nachweis der Addition konnte nur durch Elementaranalyse erbracht werden, da die Infrarotspektroskopie keine eindeutig auswertbaren Spektren des Adduktes lieferte. Aufgrund des Stickstoff- und Schwefelgehaltes des Polymeren konnte jedoch eine quantitative Reaktion angenommen werden.

2.2.2. Synthese eines polymergebundenen löslichen ß-Nitrostyrols

Als Träger für ein polymergebundenes lösliches ß-Nitrostyrol wurde Polyoxyethylen der Molmasse 6 000 ausgewählt. Polyoxyethylen weist pro Molekül zwei freie Hydroxylgruppen auf, somit bietet sich hier eine Esterbindung zum ß-Nitrostyrol an. Deshalb wurde das einfach zugängliche 4-Carboxy-ß-nitro-

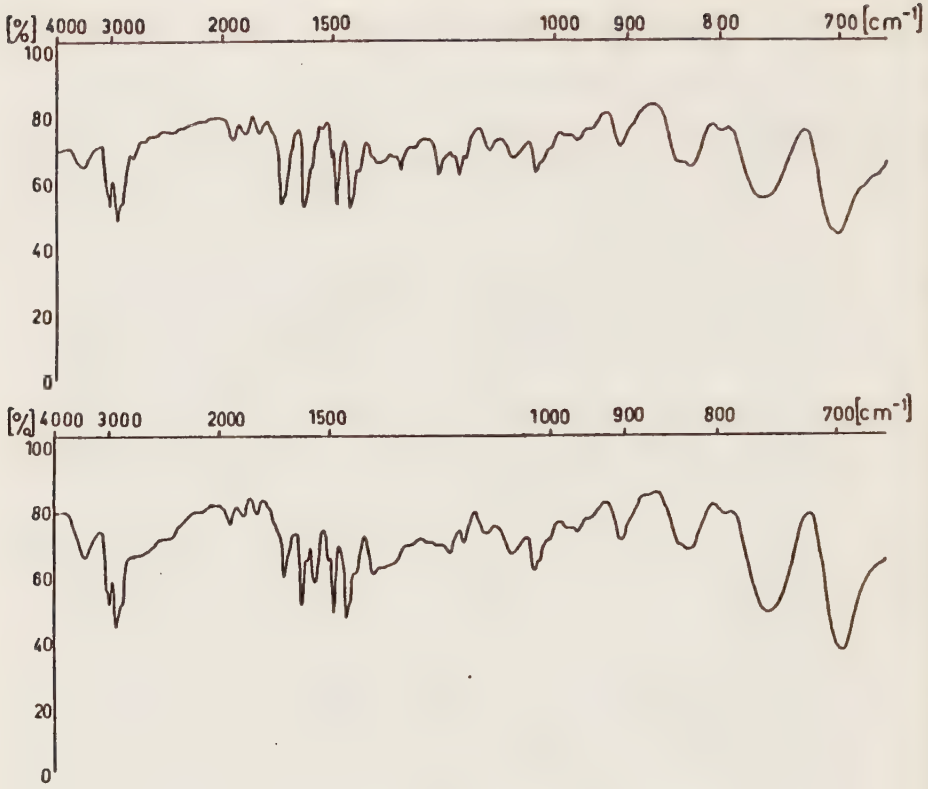


Abb. 10: Infrarotspektrum von polystyrolgebundenem Benzalehyd (a) und polystyrolgebundenem ß-Nitrostyrol (b) in KBr

styrol mit dem Polyoxyethylen und Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt. Die erwartete Veresterung blieb mit diesem Reagens allerdings aus. Durch Umsetzung des Polyoxyethylens mit dem mittels Thionylchlorid leicht erhältlichen entsprechenden Säurechlorid konnte die Reaktion erzwungen werden. Es wurde in siedendem Toluol gearbeitet, wobei man, wie inzwischen durch Albrecht und Bayer (101) an anderen Beispielen gezeigt wurde, innerhalb von 24 Stunden eine 80 - 90 prozentige Veresterung erzielen konnte. Diese Werte wurden durch Elementaranalyse ermittelt.

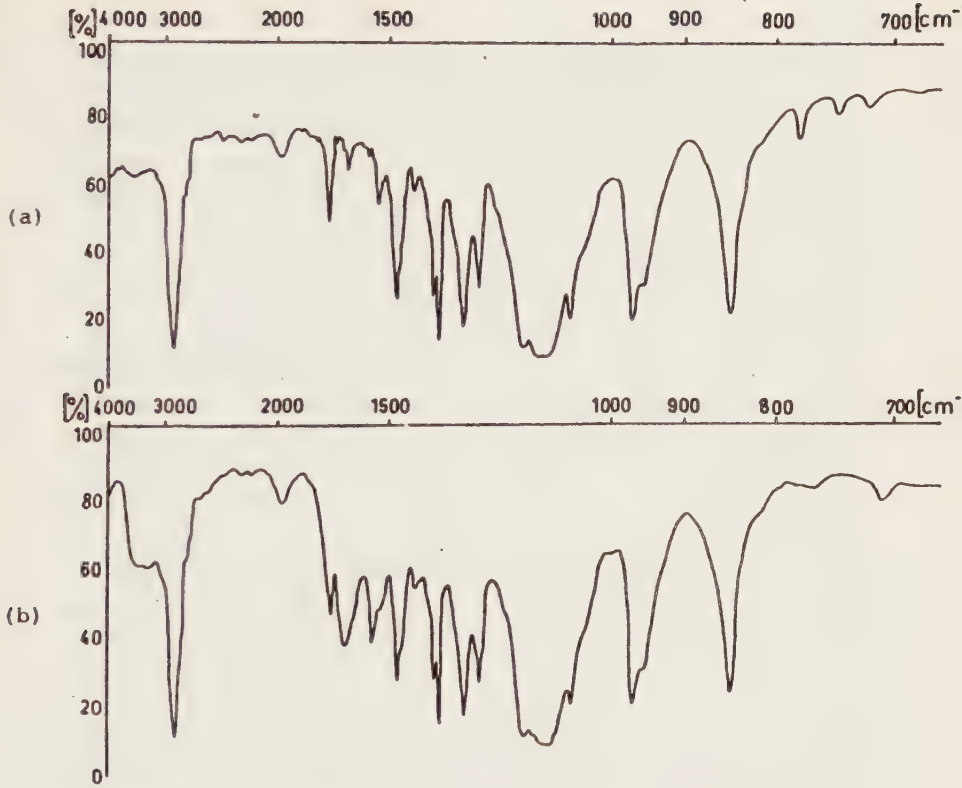


Abb. 11: Infrarotspektrum von polyoxyethylengebundenem ß-Nitrostyrol (a) und dem Addukt aus Glutathion und polyoxyethylengebundenem ß-Nitrostyrol (b) in KBr

2.2.3. Additionsreaktionen mit polyoxyethylengebundenem ß-Nitrostyrol

In Dichlormethan oder Ethanol als Lösungsmittel konnte N.-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein an polyoxyethylengebundenes ß-Nitrostyrol addiert werden. Bei Raumtemperatur wurde unter Basenkatalyse bei pH 8 stehen gelassen. Das ergab bei einem dreifachen Überschuß an Aminosäure eine quantitative Addition. Zum Nachweis der Addition wurde eine dünnschichtchromatographische Trennung im System Butanol/Eisessig/

Wasser (3:1:1) vorgenommen. Das am Start liegengebliebene Polyoxyethylen-Addukt zeigte nach Besprühen mit Ninhydrin und Entwickeln der Platte bei 100° C eine positive Ninhydrin-Reaktion. Ein weiterer schwacher Fleck mit einem R_f-Wert $\neq$ 0 deutete auf geringe Verunreinigung des Produkts durch Ausgangsmaterial bzw. oxidierte Produkte.

Auch Glutathion konnte an polyoxyethylengebundenes ß-Nitrostyrol addiert werden. Dazu mußte ein Wasser/Methanol Gemisch verwendet werden, da Glutathion in organischen Lösungsmitteln nahezu unlöslich ist. Vorteilhaft machte sich hier die Wasserlöslichkeit des polyoxyethylengebundenen ß-Nitrostyrols bemerkbar. Die Reaktion konnte deshalb in homogener Phase durchgeführt werden. Um möglichst vollständige Beladung zu erreichen, wurde ein dreifacher Überschuß an Glutathion zugesetzt. Dieser Überschuß führte allerdings bei der nachfolgenden Aufarbeitung und Reinigung zu einigen Schwierigkeiten. Folgende Methode bewährte sich dabei am besten: Das Wasser/Methanol Gemisch wurde vollständig abgezogen und der Rückstand in Ethanol aufgenommen, wobei das überschüssige Glutathion sehr fein auskristallisierte. Die Suspension wurde zentrifugiert, die klare Lösung wieder eingedampft und erneut in Ethanol aufgenommen. Hier zeigte sich nebenbei eine sehr stark verminderte Löslichkeit des polymergebundenen Addukts in Ethanol gegenüber reinem Polyoxyethylen. Deshalb mußte nach dem Zentrifugieren eine weitere Reinigung durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Methanol/Ether erfolgen. Auch dabei fiel eine verringerte Kristallisationstendenz gegenüber dem reinen Polyoxyethylen und dem polyoxyethylengebundenen ß-Nitrostyrol auf. Dies war wohl auf die Anwesenheit des Zwitterions Glutathion in Verbindung mit der polaren Nitrogruppe zurückzuführen. Normalerweise macht sich nämlich beim Einsatz der Polyoxyethylen-Träger zur Peptidsynthese eine Löslichkeitsverminderung bei so kurzen Peptiden nicht bemerkbar.

Zum Nachweis der Addition wurde das Dünnschichtchromatogramm mit Ninhydrin angefärbt. Außer dem Ninhydrin positiven Startfleck waren noch Ninhydrin positive Verunreinigungen zu erkennen, deren Gesamtanteil aber gering war. Als qualitativer Nachweis der erfolgreichen Addition wurde das Infrarotspektrum (Abb. 11, s. S. 67) herangezogen. Eine quantitative Bestimmung wurde mittels Elementar- und Aminosäureanalyse durchgeführt. Beide Analysen ergaben übereinstimmend eine Addition von Glutathion an 90 - 95 % der vorhandenen Doppelbindungen.

3. Entstehung und Trennung von diastereomeren ß-Nitrostyrol-Addukten

Bei der Addition eines optisch aktiven Thiols, wie z.B. N-Acetyl-L-cystein oder L-Glutathion an ß-Nitrostyrol wird ein weiteres Asymmetriezentrum gebildet, was zur Bildung eines Diastereomerenpaares führt, sofern nicht eine Konfiguration bevorzugt entsteht.

Aufgrund von Messungen des Circulardichroismus der Addukte konnte die Entstehung von Diastereomeren schon bald nachgewiesen werden (102). Bei Untersuchungen analoger Additionsprodukte von Cystein und Peptiden des Cysteins mit substituierten ß-Nitrostyrolen wurde eine überraschend hohe reproduzierbare Stereoselektivität der Addition festgestellt. So führte z.B. die Addition von 3,4-Dimethoxy-ß-nitrostyrol an L-Glutathion zu einem neuen Produkt mit einem Asymmetriezentrum, das die entgegengesetzte Chiralität verglichen mit dem des entsprechenden L-Cystein-Addukts besitzt.

Die Stereoselektivität sollte bei chiroptischer Verfolgung der Reaktion von ß-Nitrostyrolen mit Thiolgruppen von Enzymen Aussagen über die Topologie der Umgebung reaktionsfähiger Thiolgruppen erlauben. Zur Untersuchung solcher Umsetzungen mittels CD oder ORD könnten Auswertungen unter Verwendung von Elliptizitätsdiagrammen herangezogen werden (103).

Die Grundvoraussetzung für alle diese Anwendungen ist jedoch die Aufklärung und Zuordnung der entsprechenden Konfiguration der diastereomeren Addukte, was eine Trennung der Diastereomeren erfordert.

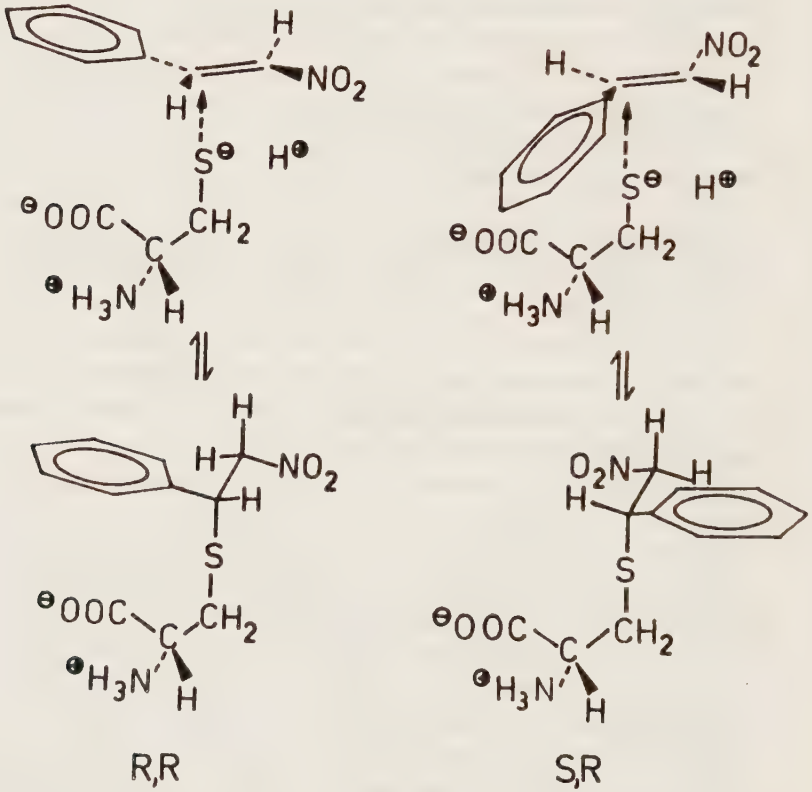


Abb. 12: Entstehung des Diastereomerenpaares bei der Addition von L-Cystein an ß-Nitrostyrol

3.1. Trennung durch fraktionierte Kristallisation

Die vier isomeren 2-Nitro-1-phenylethyl-Derivate des N-Acetyl-L- und D-cysteins ließen sich aus Essigester/Petroläther durch überraschend einfache fraktionierte Kristallisation erhalten. Die einzelnen Fraktionen konnten durch Messung des

Circulardichroismus gut unterschieden werden. Die diastereomeren Addukte zeigten Unterschiede im Löslichkeitsverhalten und im Schmelzpunkt.

Nicht in allen Fällen kristallisierten die Addukte so leicht wie eben erwähnt. So konnte zwar ein diastereomeres Addukt aus N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein und ß-Nitrostyrol in etwa 60 prozentiger Ausbeute sofort als N-Methylmorpholiniumsalz aus Ethanol kristallin erhalten werden. Andererseits mußte die Addition vollständig verlaufen sein, da eine Entfärbung der Lösung aufgetreten war und keine freien Thiolgruppen mehr nachzuweisen waren. Dies bedeutete, daß die Mutterlauge noch ein zweites schlechter kristallisierendes Diastereomeres enthalten mußte. Dieses zweite Diastereomere konnte dann auch aus dem öligen Rückstand, nach vollständigem Auskristallisieren des ersten Diastereomeren, in geringen Mengen kristallin durch Ausfällen aus Dichlormethan mit Petroläther erhalten werden. Auch bei diesen Diastereomeren konnte ein Unterschied in den Schmelzpunkten festgestellt werden.

Die gleichen Beobachtungen, die bei der obigen Reaktion zu der Schlußfolgerung führten, daß die Reaktion vollständig verlaufen war, konnten auch bei der Umsetzung von L-Glutathion mit ß-Nitrostyrol gemacht werden. Aus diesem Grunde wurde versucht, den öligen Rückstand durch Versetzen mit Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemischen zu kristallisieren. Diese Versuche führten allerdings nicht zu einem befriedigenden Ergebnis. Durch Aufnehmen des Öls in Wasser unter Zugabe von wenig Methanol und anschließende Gefriertrocknung konnte ein pulvriger Rückstand erhalten werden, der infrarotspektroskopisch, dünnschichtchromatographisch, sowie nach der Elementaranalyse mit dem sofort kristallisierenden Produkt identisch war. Während dieses jedoch stabil war, war das gefriergetrocknete Produkt luft- und feuchtigkeitsempfindlich.

3.2. Spektroskopische Untersuchungen

3.2.1. Messungen des Circulardichroismus

Sämtliche Addukte aus Cystein und dessen Derivaten, bzw. aus Glutathion mit ß-Nitrostyrolen zeichneten sich durch günstig liegende Cotton-Effekte hoher molarer Elliptizität im Bereich der Phenyl- und Nitrochromophore aus. Wie schon bald festgestellt wurde (102), zeigte der Circulardichroismus der Diastereomeren entgegengesetzte Vorzeichen der Cotton-Effekte. Auch bei Messungen von anderen Diastereomerenpaaren, z.B. von N-Salicyl-Derivaten von chiralen, aryl-substituierten Alkylaminen (104) und von Benzoesäureestern von cyclischen Diolen (119), ließen sich derartige Vorzeichenwechsel feststellen. Im Falle der N-Acetyl-L- und D-cystein Addukte erhielt man sogar fast spiegelbildliche Cotton-Effekte im langwelligen Bereich. Die CD-Spektren der beiden diastereomeren N-Acetyl-D-cystein Addukte zeigt die Abbildung 13 (s. S. 73). Das zuerst auskristallisierte Diastereomere zeigt negativen Cotton-Effekt, das später kristallisierte positiven, während es beim N-Acetyl-L-cystein Addukt umgekehrt war.

Für einige Verbindungsklassen gibt es zwar Regeln, aus denen man auf die Konfiguration ähnlicher Moleküle aufgrund der CD-Spektren schließen kann (104,105), diese lassen sich jedoch auf die Messungen der vorliegenden Addukte nicht übertragen. Deshalb konnten die Messungen des Circulardichroismus bislang nur dazu dienen, Diastereomerenpaare als solche zu erkennen, nicht aber dazu, die Konfiguration zuzuordnen.

Die CD-Spektren der getrennten Addukte aus N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein bzw. L-Glutathion und ß-Nitrostyrol zeigt Abbildung 14 (s. S. 73) und Abbildung 15 (s. S. 74). Daraus läßt sich eindeutig erkennen, daß auch im Falle des N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein Adduktes ein Diastereomerenpaar vorliegt. Beim Glutathion Addukt kann aus dem CD-Spektrum zwar auf ein Diastereomerenpaar geschlossen werden, jedoch

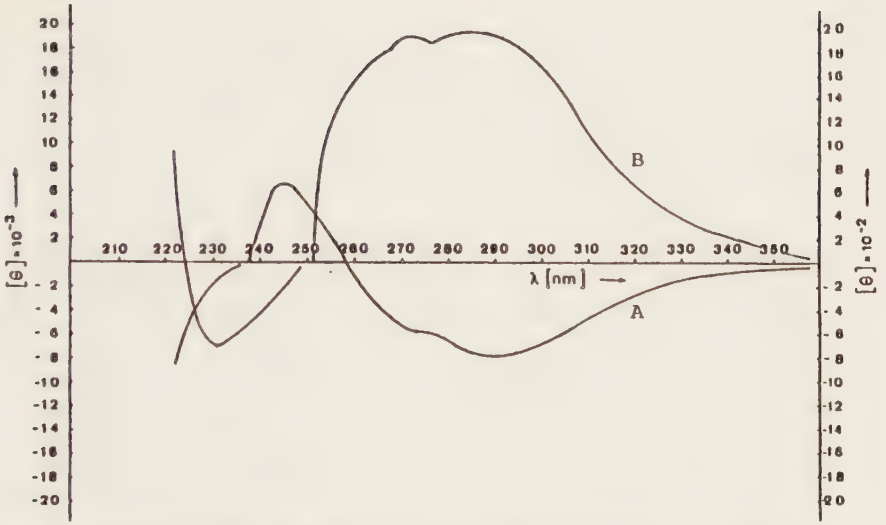


Abb. 13: CD-Spektren des Diastereomerenpaares von N-Acetyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-D-cystein in Ethanol (Uvasol) (A: 5.57 mg/5 ml; B: 3.66 mg/5 ml; 25° C)

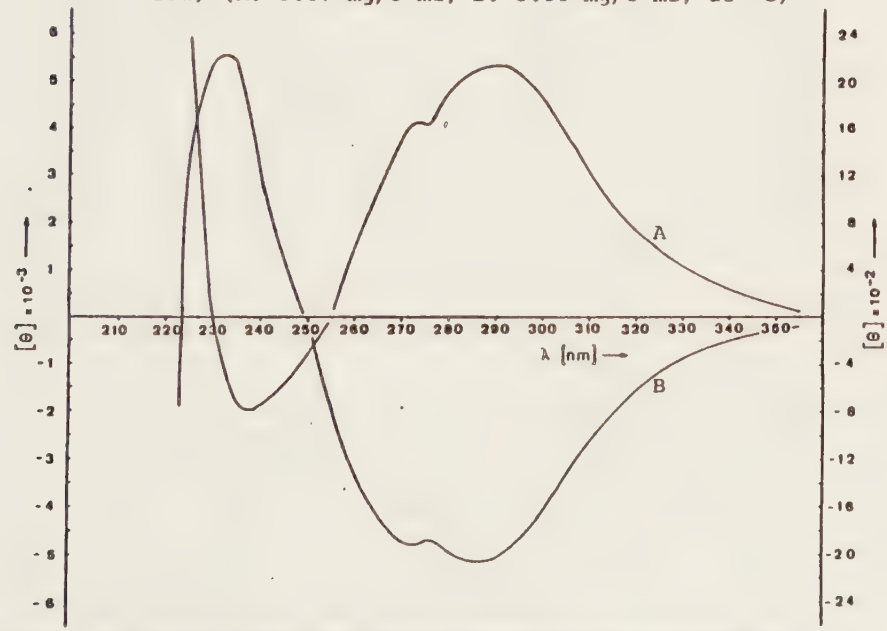


Abb. 14: CD-Spektren des Diastereomerenpaares von N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-L-cystein N-Methylmorpholiniumsalz in Methanol (Uvasol) (A: 1.95 mg/3 ml; B: 2.33 mg/3 ml; 25° C)

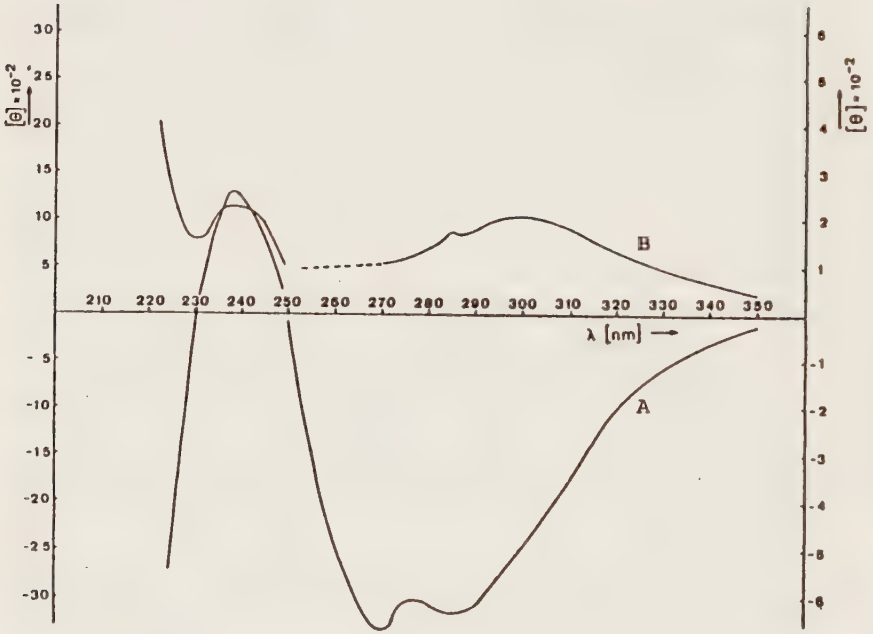


Abb. 15: CD-Spektren des Diastereomerenpaares von S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-glutathion in 0.1 N Salzsäure (A: 4.3 mg/3 ml; B: 4.8 mg/3 ml; 25° C)

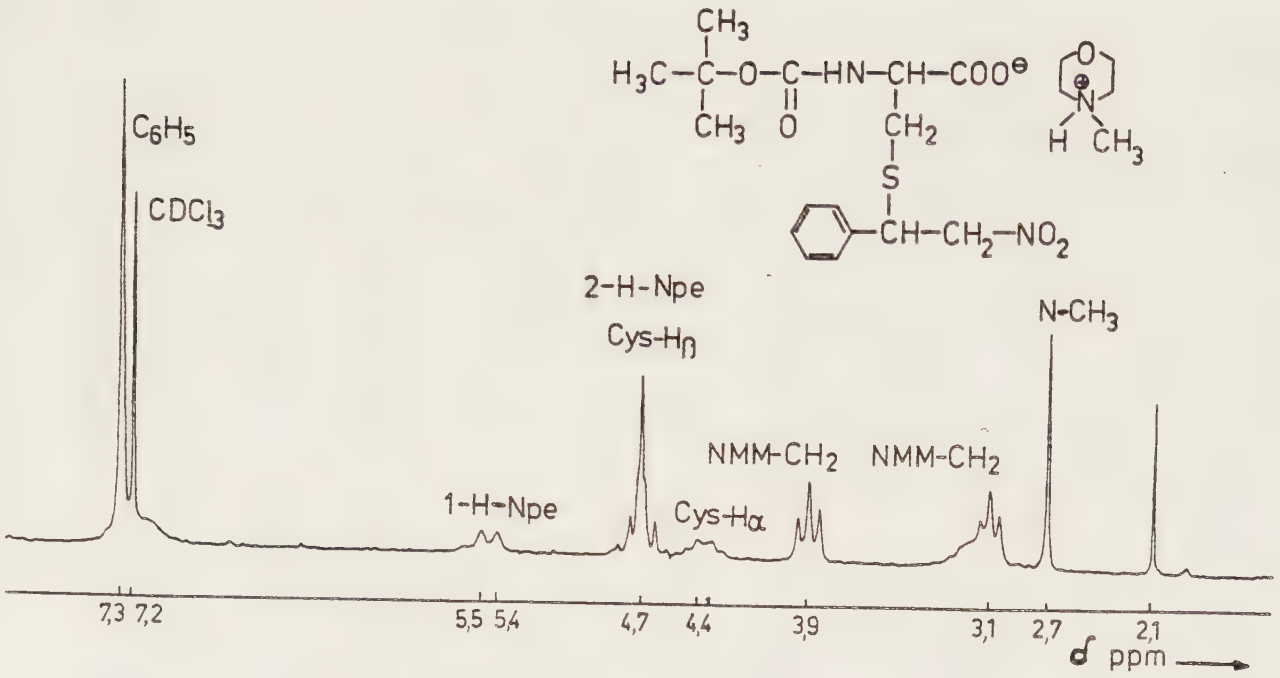


Abb. 15: ^{1}H-PFT-NMR-Spektrum von N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-L-cystein N-Methylmorpholiniumsalz in $CDCl_3$

ist nicht genau bekannt, warum die Elliptizitätswerte beim zweiten Diastereomeren so niedrig sind. Möglicherweise handelt es sich um diastereomere Verunreinigungen, die nicht restlos zu entfernen sind.

3.2.2. Messungen der kernmagnetischen Resonanz

Die diastereomeren Addukte unterscheiden sich lediglich durch die Stellung eines Wasserstoffatoms am α-Kohlenstoff des Nitrophenylethyl-Restes (Abb. 12, s. S. 70). Durch Aufnahme des ^{1}H-NMR-Spektrums der diastereomeren Addukte sollte, wie es auch in vielen anderen Fällen möglich war (s. z.B. Lit. 106), eine Bestimmung der absoluten Konfiguration möglich sein. Die Spektren der diastereomeren Addukte erwiesen sich jedoch als völlig identisch (Abb. 15, s. S. 75). Es war keine Verschiebung festzustellen, die eine Bestimmung der absoluten Konfiguration eventuell ermöglicht hätte.

3.3. Chromatographische Untersuchungen

Zur Trennung von Racematen und zur Bestimmung der absoluten Konfiguration ist die Gaschromatographie an mit chiralen Phasen belegten Kapillarsäulen besonders geeignet (116,117). Die Gaschromatographie erfordert jedoch leicht flüchtige Substanzen, so daß Aminosäuren derivatisiert werden müssen. Deshalb wurden die beiden diastereomeren Addukte des N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cysteins mit Isopropanol/Chlorwasserstoff, unter gleichzeitiger Abspaltung der Aminoschutzgruppe, verestert und danach die Aminogruppe mit Pentafluorpropionsäureanhydrid umgesetzt. Die Trennung der Diastereomeren sollte an der von Frank, Nicholson und Bayer neu entwickelten stationären Phase aus Polysiloxan und L-Valin-tert.-butylamid (116) erfolgen. Eine Trennung war aber nicht möglich, da sich stets eine ganze Reihe von Peaks ergaben, deren Zuordnung nicht möglich war. Wahrscheinlich trat eine Zersetzung ein, die die Ursache für die zahlreichen Peaks war.

4. Experimenteller Teil

4.1.1. Darstellung von N-Benzyloxycarbonyl-L-alanin (107)

35.6 g (0.4 mol) L-Alanin werden in 120 ml Wasser und 80 ml Dioxan suspendiert und unter Rühren mit 4 N Natronlauge auf pH 8.5 eingestellt. Nach Zugabe von 75.5 g (0.44 mol) Benzyloxycarbonylchlorid wird am pH-Stat bei pH 8.5 die entsprechende Menge 4 N Natronlauge zugegeben, bis nach 4 h die Reaktion beendet ist. Überschüssiges Benzyloxycarbonylchlorid wird mit 3 x 150 ml Essigester extrahiert. Man überschichtet dann mit 300 ml Essigester, säuert mit verd. Salzsäure auf pH 2 an, trennt die Essigesterphase ab, extrahiert mit 2 x 200 ml Essigester nach, wäscht die vereinigten Extrakte mit Wasser und trocknet über Natriumsulfat. Nach Einengen der Lösung wird durch Zugabe von Petroläther (30 - 50° C) in der Kälte auskristallisiert.

Ausb. 71 g (80 %)
Schmp. 85 - 86° C (Lit. (107) 86 - 87° C)
$[\alpha]_{578}^{25}$ = -14.2 (c = 1 in Eisessig)
$C_{11}H_{13}NO_4$ (223.2)
Ber. C 59.19 H 5.87 N 6.27
Gef. C 58.21 H 5.74 N 6.59

4.1.2. Darstellung von L-Alanin-tert.-butylesterhydrochlorid

N-Benzyloxycarbonyl-L-alanin-tert.-butylester (108)

Nach der allgemeinen Vorschrift von G.W.Anderson werden in einer druckfesten Flasche 22.3 g (0.1 mol) N-Benzyloxycarbonyl-L-alanin in 200 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst und 2 ml konz. Schwefelsäure zugegeben. Man kühlt auf 0° C ab und kondensiert etwa 55 g (1 mol) Isobutylen ein. Dann läßt man 3 d unter gelegentlichem Schütteln unter Druck

stehen. Dann kühlt man wieder auf 0° C ab, öffnet vorsichtig und gießt unter gutem Rühren in eine kalte 1 m Natriumcarbonat-Lösung. Nach Verdampfen des Isobutylens trennt man die organische Phase ab, wäscht mit 3 x 50 ml 1 m Natriumcarbonat-Lösung, 3 x 50 ml 10 proz. Zitronensäure und dann mit Wasser neutral, trocknet über Natriumsulfat und dampft bis zur Trockne ein. Der ölige Rückstand wird noch 2 d im Ölpumpenvak. über P_2O_5 getrocknet und sofort weiterverarbeitet.

Ausb. 26 g (95 %)
$C_{15}H_{21}NO_4$ (279.34)
Ber. C 64.50 H 7.58 N 5.01
Gef. C 64.45 H 7.76 N 5.23

L-Alanin-tert.-butylesterhydrochlorid (109)

26 g (90 mmol) N-Benzyloxycarbonyl-L-alanin-tert.-butylester werden in Methanol gelöst und am pH-Stat unter Zugabe von verd. Salzsäure bei pH 6 unter Druck mit 500 mg Palladium/Kohle als Katalysator hydriert. Nach Aufnahme der entsprechenden Menge Wasserstoff wird der Katalysator abfiltriert und mit Methanol nachgewaschen. Danach wird das Filtrat zur Trockne eingedampft, mit wasserfreiem Methanol wieder aufgenommen und mit Ether vorsichtig ausgefällt.

Ausb. 14 g (85 %)
Schmp. 171 - 173° C (Lit. (103) 174 - 175° C)
$[\alpha]_{578}^{20}$ = +2.3 (c = 1 in Ethanol)
$[\alpha]_{578}^{20}$ = +2.33 (c = 1.03 in Ethanol) (109)
$C_7H_{16}NO_2Cl$ (181.7)
Ber. C 46.40 H 8.89 N 7.72 Cl 19.55
Gef. C 46.46 H 8.62 N 7.42 Cl 18.81

4.1.3. Darstellung von N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-L-cystein

Bis-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystin (38)

30 g (0.125 mol) L-Cystin werden in Dioxan/Wasser (2 : 1) suspendiert und mit 40 g (0.28 mol) BOC-N_3 versetzt. Am pH-Stat gibt man bei pH 11.2 die entsprechende Menge 4 N Natronlauge zu. Nach etwa 25 h wird überschüssiges BOC-N_3 mit Ether extrahiert, die Lösung mit Essigester überschichtet und mit verd. Salzsäure auf pH 2 gebracht, bis sich der entstandene Niederschlag restlos aufgelöst hat. Man extrahiert noch zweimal mit Essigester, wäscht die vereinigten Extrakte mit Wasser und trocknet über Natriumsulfat. Man filtriert ab und engt i. Vak. ein. Nach Zugabe von Petroläther (30 - 50° C) läßt man in der Kälte auskristallisieren.

Ausb. 35 g (64 %)
Schmp. 149 - 150° C (Lit. (38) 145 - 146° C)
$[\alpha]_{578}^{20}$ = -115.5 (c = 1 in Eisessig)
$[\alpha]_{578}^{20}$ = -114.6 (c = 1 in Eisessig) (38)
$C_{16}H_{28}N_2O_8S_2$ (440.5)
Ber. C 43.62 H 6.40 N 6.36
Gef. C 43.44 H 6.40 N 6.12

N.-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein (111)

In 300 ml flüssigem Ammoniak werden 17.6 g (40 mmol) Bis-BOC-L-Cystin gelöst und so lange mit kleinen Natriumschnitzeln versetzt, bis die blaue Farbe etwa 30 s bestehen bleibt. Danach läßt man den Ammoniak verdampfen und evakuiert noch 1 h an der Ölpumpe. Der Rückstand wird in Eiswasser gelöst und mit stark gekühlter 3 N Salzsäure auf pH 2 gebracht. Die wäßrige Lösung wird mit 5 x 100 ml

Essigester extrahiert, die vereinigten Extrakte werden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels kristallisiert das Öl nach mehrtägigem Evakuieren an der Ölpumpe oder beim Animpfen. Umkristallisiert wird aus Essigester/Petroläther.

Ausb. 13.5 g (76 %)
Schmp. 74° C (Lit. (111) 76 - 78° C)
$[\alpha]_{578}^{20}$ = +8.9 (c = 1 in Ethanol)
$[\alpha]_{D}^{24}$ = +8.1 (c = 1 in Ethanol)
$C_8H_{15}NO_4S$ (221.3)
Ber. C 43.42 H 6.83 N 6.33
Gef. C 43.51 H 6.73 N 6.31

N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-L-cystein N-Methylmorpholiniumsalz

Zu 22.1 g (0.1 mol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein und 14.9 g (0.1 mol) ß-Nitrostyrol in 100 ml wasserfreiem, N_2-gesättigtem Ethanol werden unter Rühren 10 ml N-Methylmorpholin gegeben. Nach etwa 2 min fällt ein farbloses Produkt aus. Man kühlt auf 0° C und saugt ab. Man wäscht dieses Produkt (Diastereomeres A) mit Ether und trocknet i. Vak. Die Mutterlauge wird eingeengt und mit wenig Ethanol aufgenommen. Durch Zugabe von Petroläther (30 - 50° C) erhält man weitere Fraktionen des Diastereomeren A. Die Mutterlauge wird erneut zur Trockne eingedampft und in Dichlormethan aufgenommen, wenig Petroläther zugegeben und kühl gestellt. Nach einigen Tagen kristallisiert das Diastereomere B aus. Umkristallisiert werden beide aus Dichlormethan/Petroläther.

Ausb. 35 g (75 %) (A + B)
Schmp. 131 - 133° C (A), 83 - 85° C (B)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = +73.3 (c = 1 in Chloroform) (A)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = +87.3 (c = 0.7 in Chloroform) (B)

$C_{21}H_{33}N_3O_7S$ (471.5)

Ber. C 53.94 H 7.05 N 8.91 S 6.78

Gef. C 52.72 H 6.74 N 8.28 S 8.01 (A)

Gef. C 52.22 H 6.61 N 8.09 S 8.04 (B)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-L-cystein

Die freie Säure läßt sich aus dem Salz durch Essigesterextraktion einer angesäuerten, wäßrigen Lösung isolieren und aus Essigester/Petroläther (30 - 50° C) umkristallisieren.

Schmp. 74 - 77° C

$[\alpha]_{578}^{20}$ = -59.0 (c = 1 in Ethanol)

$C_{16}H_{22}N_2O_6S$ (370.4)

Ber. C 51.88 H 5.99 N 7.56 S 8.66

Gef. C 52.07 H 6.13 N 7.45 S 8.43

4.2. Darstellung von S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-cysteinyl-alanyl-alanin

N-Benzyloxycarbonyl-L-alanyl-alanin-tert.-butylester

In einem Gemisch von 120 ml wasserfreiem Dichlormethan und Tetrahydrofuran (1 : 1) werden 11.2 g (50 mmol) N-Benzyloxycarbonyl-L-alanin, 9 g (50 mmol) L-Alanin-tert.-butylesterhydrochlorid und 7.6 g (50 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol gelöst. Man stellt die Lösung mit N-Methylmorpholin auf pH 7 - 8, kühlt auf 0° C ab und gibt 10.3 g (50 mmol) DCCI in wenig Dichlormethan gelöst zu. Nach 20 min bei 0° C läßt man noch 1 h bei Raumtemp. stehen, wobei mit N-Methylmorpholin auf pH 7 - 8 gehalten wird. Nach Beendigung der Reaktion filtriert man ab und zieht das Lösungsmittel i. Vak.

vollständig ab. Man nimmt in Essigester auf, wäscht mit 3 x 50 ml 10 proz. Zitronensäure, 3 x 50 ml 10 proz. $NaHCO_3$ und danach mit Wasser neutral, trocknet über Natriumsulfat und fällt durch Zugabe von Petroläther in der Kälte aus.

Ausb. 14 g (80 %)
Schmp. 69 - 71° C (Lit. (112) 70 - 71° C)
$[\alpha]_{578}^{20}$ = -47.0 (c = 1 in Ethanol)
$C_{18}H_{26}N_2O_5$ (350.4)
Ber. C 61.70 H 7.48 N 7.99
Gef. C 61.33 H 7.41 N 7.81

L-Alanyl-alanin-tert.-butylesterhydrochlorid (109)

Man löst 7.4 g (20 mmol) N-Benzyloxycarbonyl-L-alanyl-alanin-tert.-butylester in 100 ml wasserfreiem Ethanol, gibt 500 mg Palladium/Kohle als Katalysator zu und hydriert unter Druck, wobei am pH-Stat durch Zugabe von verd. Salzsäure ein pH 7 konstant gehalten wird. Nach Aufnahme der berechneten Menge Wasserstoff filtriert man den Katalysator ab, wäscht mit Ethanol nach und zieht das Lösungsmittel bis zur Trockne ab. Der Rückstand wird im Ölpumpenvak. getrocknet und das glasartige Produkt ohne weitere Reinigung direkt zu Synthesen verwendet.

Ausb. 4.5 g (90 %)
$C_{10}H_{21}N_2O_3Cl$ (251.8)
Ber. C 47.52 H 8.37 N 11.08 Cl 14.02
Gef. C 48.69 H 8.62 N 11.31 Cl 9.66

N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-L-cysteinyl-alanyl-alanin-tert.-butylester

2.5 g (10 mmol) L-Alanin-alanyl-tert.-butylesterhydrochlorid, 1.5 g (10 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol sowie 4.7 g (10 mmol)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-L-cystein N-Methylmorpholiniumsalz werden in 50 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0° C gekühlt. Nach Zugabe von 2.1 g (10 mmol) DCCI in wenig Dichlormethan rührt man 30 min bei 0° C, hält dann mit N-Methylmorpholin 2 h bei Raumtemp. auf pH 7 - 8, filtriert ab und dampft das Filtrat i. Vak. bis zur Trockne ein. Man nimmt in etwas Essigester auf, wäscht mit 3 x 50 ml 10 proz. Zitronensäure, 3 x 50 ml 10 proz. $NaHCO_3$ und Wasser neutral, trocknet über Natriumsulfat und läßt nach Zugabe von Petroläther (30 - 50° C) in der Kälte auskristallisieren.

Ausb. 3.6 g (64 %)
Schmp. 143 - 145° C
$[\alpha]_{578}^{20}$ = +46.1 (c = 1 in Chloroform)
$C_{26}H_{40}N_4O_8S$ (568.6)
Ber. C 54.91 H 7.08 N 9.85 S 5.64
Gef. C 54.37 H 6.95 N 9.68 S 7.50

S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-cysteinyl-alanyl-alanin

3.6 g (6.4 mmol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-L-cysteinyl-alanyl-alanin-tert.-butylester werden in 20 ml 1.2 N HCl/Eisessig gelöst und bei Raumtemp. 130 min gerührt. Dann wird i. Vak. eingedampft und der Rückstand über Kaliumhydroxid mehrere Tage i. Vak. getrocknet. Der glasartige Rückstand wird mit wasserfreiem Ether übergossen und mehrere Stunden gerührt. Das hierbei kristallin anfallende Peptidhydrochlorid wird abgesaugt und getrocknet.

Ausb. 2.8 g (97 %)
$C_{17}H_{25}N_4O_6SCl$ (448.9)
Ber. C 45.48 H 5.61 N 12.48 S 7.14 Cl 7.89
Gef. C 45.25 H 5.59 N 12.26 S 7.49 Cl 8.02

4.3. Darstellung von ß-Nitrostyrolen

ß-Nitrostyrol (80)

In einem 1 l Dreihalskolben mit Rührer, Tropftrichter und Innenthermometer werden 61 g (1 mol) Nitromethan und 106 g (1 mol) Benzaldehyd in 300 ml Methanol gelöst. Unter Kühlung und kräftigem Rühren tropft man eine Lösung von 42 g Natriumhydroxid in 100 ml Wasser bei 10 - 15° C Innentemp. zu. Man läßt noch 15 min stehen und löst den sich bildenden Niederschlag durch Zugabe von 600 ml eiskaltem Wasser auf. Die gekühlte Lösung wird zu einer gerührten Lösung von 200 ml konz. Salzsäure und 300 ml Wasser getropft, wobei das Produkt auskristallisiert. Man saugt ab, wäscht mit viel Wasser, trocknet und kristallisiert aus Ethanol um.

Ausb. 110 g (75 %)
Schmp. 57° C (Lit. (80) 57° C)

4-[ß-Nitrovinyl]-benzoesäure

Man löst 4 g (40 mmol) 4-Carboxy-benzaldehyd in wasserfreiem Methanol und gibt 3.1 g (50 mmol) Nitromethan dazu. Die Lösung wird auf 0° C gekühlt und dann eine Lösung von 4.5 g (80 mmol) Natriumhydroxid in 100 ml wasserfreiem Methanol langsam, ohne daß die Temp. über 0° C steigt, zugetropft (ein Äquivalent Base dient zur Neutralisation der Carboxylgruppe). Nach Zugabe der Base wird die alkoholische Lösung mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und in einen Überschuß an 5 N Salzsäure getropft. Dabei fällt das Produkt in gelben Nadeln aus. Man saugt ab, wäscht mit Wasser und kristallisiert aus wäßrigem Ethanol um.

Ausb. 4.7 g (61 %)
Schmp. 282° C (Lit. (110) 283 - 284° C, (88) 282° C)

$C_9H_7NO_4$ (193.2)

Ber. C 55.96 H 3.65 N 7.25
Gef. C 56.32 H 3.59 N 7.20

4-[ß-Nitrovinyl]-benzoesäurechlorid

In 10 ml frisch dest. Thionylchlorid werden 1.95 g (0.01 mol) 4-[ß-Nitrovinyl]-benzoesäure 12 h am Rückfluß gekocht. Man läßt auf Raumtemp. abkühlen und zieht dann das überschüssige Thionylchlorid vorsichtig i. Vak. ab. Man erhält gelbe Kristalle, die ohne weitere Reinigung sofort zur Synthese verwendet werden.

Ausb. 2.1 g (100 %)
Schmp. 150 - 151° C
$C_9H_6NO_3Cl$ (211.6)

Ber. C 55.26 H 3.09 N 7.16 Cl 18.12
Gef. C 50.95 H 3.05 N 6.51 Cl 17.18

4.3.1. Darstellung von polystyrolgebundenem ß-Nitrostyrol

Polystyrolgebundener Benzaldehyd (100)

45 g chlormethyliertes Polystyrol (Merrifield-Harz, Merck, Darmstadt, 1.0 - 1.5 mmol Cl/g) werden in 300 ml Dimethylsulfoxid mit 19 g $NaHCO_3$ 6 h bei 155° C gerührt. Dann wird auf einer Glasfritte G 3 abgesaugt, mit Dimethylsulfoxid, heißem Wasser, einer Mischung aus Dioxan/Wasser (2 : 1), Dioxan, Aceton, Ethanol und Dichlormethan gewaschen und i. Vak. getrocknet. Die Elementaranalyse ergibt, daß das Harz kein Chlor mehr enthält.

Ausb. 44 g
IR (KBr): Abb. 10 (s. S. 66)

Polystyrolgebundenes ß-Nitrostyrol

In 100 ml Pyridin werden 20 g polystyrolgebundener Benzaldehyd suspendiert. Dazu gibt man 7 g Nitromethan und 1 g n-Butylamin als Katalysator. Man erwärmt unter Rühren auf 60° C, beläßt 1 h bei 60° C und 3 h bei 90° C. Dann läßt man auf Raumtemp. abkühlen, saugt auf einer Glasfritte G 3 ab, wäscht mit Methanol und Dichlormethan und trocknet i. Vak. über P_2O_5.

Elementaranalyse: N 1.3, entsprechend einer Beladung von 0.9 mmol Nitrogruppen/g.

4.3.2. Darstellung von polyoxyethylengebundenem ß-Nitrostyrol

Zu einer Lösung von 6 g (2 mmol) Polyoxyethylen der Molmasse 6 000 in 100 ml Toluol gibt man 1.2 g (6 mmol) 4-[ß-Nitrovinyl]-benzoesäurechlorid. Zur Neutralisation des entstehenden Chlorwasserstoffs gibt man Pyridin zu und läßt 12 h am Rückfluß kochen. Man filtriert das Pyridiniumchlorid aus der heißen Lösung ab, läßt abkühlen und dampft i. Vak. ein. Der Rückstand wird in 30 ml Dichlormethan aufgenommen, die Lösung erneut filtriert und dann das Polymer mit Ether ausgefällt. Zur Reinigung wird mehrmals aus Ethanol/Ether umkristallisiert. Anschließend wird i. Vak. über P_2O_5 getrocknet.

Ausb. 6.2 g
Elementaranalyse: N 0.4, entsprechend einer Beladung von 0.28 mmol Nitrogruppen/g (86 %).
IR (KBr): Abb. 11 (s. S. 67)

4.3.3. Darstellung der polymergebundenen Addukte

N-Acetyl-S-polystyrolgebundenes-2-nitro-1-phenylethyl-L-cystein

Man suspendiert 2.2 g polystyrolgebundenes ß-Nitrostyrol (2 mmol Kapazität) in 20 ml wasserfreiem Ethanol und gibt unter Rühren 1.5 g (10 mmol) N-Acetyl-L-cystein, gelöst in wenig Ethanol, zu. Man stellt mit N-Methylmorpholin auf pH 7 - 8 ein und läßt dann bei Raumtemp. etwa 24 h unter leichtem Rühren stehen. Dann saugt man auf einer Glasfritte G 3 ab, wäscht mit Ethanol, Dichlormethan und Ether und trocknet i. Vak. über P_2O_5.

Elementaranalyse: N 2.82 S 2.16, entsprechend einer Beladung von 0.7 - 1.0 mmol Cystein/g.

N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-polyoxyethylengebundenes-2-nitro-1-phenylethyl-L-cystein

In 10 ml wasserfreiem Dichlormethan oder Ethanol werden 1 g (0.3 mmol) polyoxyethylengebundenes ß-Nitrostyrol und 220 mg (1 mmol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein gelöst. Man stellt mit N-Methylmorpholin auf pH 7 - 8 ein und rührt 24 h bei Raumtemp. Das Polymer wird durch Zugabe von Ether ausgefällt und mehrmals aus Ethanol/Ether umkristallisiert. Anschließend wird i. Vak. über P_2O_5 getrocknet.

Elementaranalyse: N 0.7, entsprechend einer Beladung von 0.25 mmol Cystein/g (75 %).

S-Polyoxyethylengebundenes-2-nitro-1-phenylethyl-L-glutathion

Man löst 306 mg (1 mmol) L-Glutathion in 30 ml N_2-gesättigtem Wasser und gibt eine Lösung von 1 g polyoxyethylengebundenem ß-Nitrostyrol (0.3 mmol Kapazität) in 20 ml N_2-gesättigtem Methanol zu. Dann wird mit N-Methylmorpholin auf

pH 7 - 8 eingestellt und bei Raumtemp. 24 h gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand in wasserfreiem Ethanol aufgenommen. Das hierbei ausfallende L-Glutathion wird bei 12 000 /min abzentrifugiert. Die klare Lösung wird nochmals stark eingeengt und der Rückstand erneut in Ethanol aufgenommen. Nach Zentrifugieren wird durch Zugabe von Ether ausgefällt. Das hierbei anfallende Öl wird nach Abdekantieren in Methanol aufgenommen und durch vorsichtige Zugabe von Ether kristallisiert. Es wird noch mehrmals aus Methanol/Ether umkristallisisert und dann i. Vak. über P_2O_5 getrocknet.

Elementaranalyse: N 2.01, entsprechend einer Beladung von 0.3 mmol Glutathion/g (98 %).

4.4.1. Darstellung von N-Acetyl-S-2-nitro-1-phenylethyl-D-cystein

Zu einer Lösung von 3.2 g (20 mmol) N-Acetyl-D-cystein und 3.0 g (20 mmol) ß-Nitrostyrol in 30 ml wasserfreiem Ethanol gibt man 2 ml (20 mmol) N-Methylmorpholin und läßt unter mäßigem Rühren 24 h stehen. Anschließend wird das Ethanol i. Vak. abgezogen, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit 10 proz. Zitronensäure und Wasser gewaschen. Dann extrahiert man mit 10 proz. Natriumcarbonatlösung, säuert die vereinigten Extrakte mit verd. Salzsäure auf pH 2 an und extrahiert mit Essigester. Die Essigesterextrakte werden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdampfen des Essigesters wird der Rückstand i. Vak. über P_2O_5 getrocknet und dann mit Ether behandelt. Hierbei kristallisiert ein Teil des Produkts. Man filtriert ab und versetzt die Mutterlauge mit Petroläther (30 - 50° C) bis die zweite Fraktion auskristallisiert. Dann werden beide Fraktionen aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausb. 4.6 g (74 %) (A + B)

Schmp. 95 - 98° C (A), 130 - 132° C (B)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = -24.0 (c = 1 in Ethanol) (A)

$[\alpha]_{578}^{20}$ = +138.5 (c = 1 in Ethanol) (B)

$C_{13}H_{16}N_2O_5S$ (312.3)

Ber. C 50.00 H 5.12 N 8.97 S 10.25
Gef. C 49.32 H 5.09 N 8.80 S 10.26 (A)
Gef. C 52.02 H 5.44 N 9.12 S 10.89 (B)

4.4.2. Darstellung von S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-cystein

In 50 ml N_2-gesättigtem Wasser werden 1.2 g (10 mmol) L-Cystein gelöst. Dazu gibt man unter Rühren 1.5 g (10 mmol) ß-Nitrostyrol in 100 ml N_2-gesättigtem Methanol. Man gibt noch 10 mmol Triethylamin zu und läßt unter N_2 bei Raumtemp. stehen. Das Addukt kristallisiert nach kurzer Zeit oder beim Einengen der Lösung aus. Die Kristalle werden abfiltriert, mit etwas Wasser gewaschen und i. Vak. getrocknet.

Ausb. 2.6 g (48 %)
Schmp. 174 - 176° C (Zers.)
$C_{11}H_{14}N_2O_4S$ (270.2)
Ber. C 48.48 H 5.22 N 10.37 S 11.84
Gef. C 48.88 H 5.24 N 10.31 S 12.51

4.4.3. Darstellung von S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-glutathion

In 75 ml N_2-gesättigtem Wasser werden 3.1 g (10 mmol) L-Glutathion gelöst. Dazu gibt man 1.5 g (10 mmol) ß-Nitrostyrol in 150 ml N_2-gesättigtem Methanol und 10 mmol Triethylamin. Man läßt unter N_2 bei Raumtemp. reagieren. Nach etwa 10 min ist kein Thiol mehr nachweisbar und die Lösung farblos. Nach 3 - 4 h filtriert man und dampft i. Vak. ein. Der ölige Rückstand wird in wenig Methanol aufgenommen und tropfenweise mit 10 mmol konz. Salzsäure versetzt. Der dabei ausfallende mikrokristalline Rückstand wird abfiltriert,

mit wenig wasserfreiem Methanol gewaschen und i. Vak. getrocknet. Das Filtrat wird eingeengt und kühl gestellt, wobei weiteres Produkt kristallisiert. Das aus der Mutterlauge übrig gebliebene Öl wird mit Wasser versetzt und mit verd. Ammoniak auf pH 4 gebracht. Die organische Phase wird abgetrennt, nochmals mit Wasser gewaschen, in Methanol aufgenommen und vorsichtig mit Wasser versetzt. Das anfangs ausfallende stark verunreinigte Produkt wird verworfen, die wäßrige Lösung gefriergetrocknet.

Ausb. 2.6 g (57 %) (A), 1.4 g (31 %) (B)
Schmp. 171 - 173° C (A), 150 - 153° C (B)
$C_{18}H_{24}N_4O_8S$ (456.4)
Ber. C 47.37 H 5.30 N 12.28 S 7.03
Gef. C 46.47 H 5.36 N 11.94 S 6.98 (A)
Gef. C 45.41 H 4.90 N 11.14 S 8.24 (B)

4.5. Abspaltung der Schutzgruppe aus S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-glutathion

113 mg (0.25 mmol) S-2-Nitro-1-phenylethyl-L-glutathion werden in 2 ml 1 N Natriumhydroxid in wasserfreiem Ethanol suspendiert und unter N_2 für 5 min gerührt. Dann gibt man 0.5 ml Wasser zu und rührt weitere 25 min. Nach Neutralisation mit 2 ml 1 N Schwefelsäure gibt man 5 ml Chloroform zu und säuert unter Rühren mit 5 ml 1 N Schwefelsäure an. Die Chloroform-Phase wird abgetrennt, die wäßrige Phase noch zweimal mit wenig Chloroform extrahiert. Dann wird saure $HgSO_4$-Lösung tropfenweise zugegeben, bis kein Niederschlag mehr ausfällt (113,114). Man zentrifugiert ab, wäscht mit Wasser und trocknet i. Vak. über KOH und P_2O_5.

Ausb. 135 mg (66 %)

120 mg des Glutathion-Quecksilbersalzes werden in Wasser suspendiert; dann leitet man 10 min H_2S ein und filtriert vom HgS ab. Die klare Lösung wird zur Entfernung von evtl.

noch vorhandenem ß-Nitrostyrol mit Chloroform extrahiert und dann gefriergetrocknet. Das zurückbleibende weiße Pulver ist mit Glutathion identisch und nur wenig verunreinigt.

Ausb. 80 mg (67 %)

5. Geräte und Reagentien

Folgende Geräte und Instrumente wurden verwendet:

Schmelzpunktsapparat nach Dr. Tottoli der Firma Büchi, Flawil
Perkin-Elmer-Digital-Polarimeter
Aminosäureanalysator Beckmann Unichrom und Multichrom
Fraktionssammler mit optischer Einheit UA 5 der Firma ISCO
Dosimat mit pH-Meter E 512, Impulsomat E 473 und Glaselektrode EA 121; Dosimat E 535 und Potentiograph E 536, Firma Metrohm, Herisau
Mikroglaselektrode der Firma Schott, Mainz
IR-Spektrograph Infracord der Firma Perkin-Elmer
Dünnschichtelektrophorese Apparatur der Firma Camag
Gaschromatograph Fractovap 2101 der Firma Carlo Erba
Dichrograph II der Firma Roussel-Jouan, Paris
NMR-Spektrometer Bruker HFX 90, WP 60 und WH 80

Chemikalien:

Die verwendeten L-Aminosäuren wurden von der Firma Merck, Darmstadt, geliefert.
Polyoxyethylen wurde von der Firma Roth, Karlsruhe und der Firma Hoechst, Frankfurt/Main, geliefert.
Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} der Firma Merck, Darmstadt verwendet.

4-Chlor-3-nitrobenzylalkohol wurde von Aldrich, Milwaukee, Wisconsin bezogen.
Das Copolymer aus 98 % Styrol und 2 % Divinylbenzol wurde von der Firma Fluka, Buchs bezogen.
Bio Beads S-X1 wurden von Bio Rad Laboratories, Richmond, Calif. geliefert.

Lösungsmittel:

Dichlormethan wurde über P_2O_5 getrocknet und über Kaliumcarbonat destilliert.
Essigsäure wurde über P_2O_5 destilliert.
Ether wurde mit Natriumsuspension in Paraffin absolutiert (Indikator Benzophenon) und destilliert.
Ethanol und Methanol wurden mit Magnesium absolutiert und destilliert.
Essigester wurde über P_2O_5 destilliert.
Petroläther wurde über Schwefelsäure destilliert.
Tetrahydrofuran wurde mit Natriumsuspension in Paraffin absolutiert und destilliert.

6. Abkürzungen

BOC	tert.-Butyloxycarbonyl-
BOC-N_3	tert.-Butyloxycarbonylacid
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
NPE	2-Nitro-1-phenylethyl-
PHBT	Polymergebundenes 1-Hydroxybenzotriazol
PHNB	Polymergebundenes o-Nitrophenol
POE	Polyoxyethylen

V. Zusammenfassung

Es wurde ein Syntheseverfahren entwickelt, bei dem C-terminal an solubilisierendes Polyoxyethylen als Träger gebundene Peptide zur Kettenverlängerung quantitativ mit aktivierten, N-geschützten Aminosäureestern, die an eine unlösliche Polystyrolmatrix gebunden sind, umgesetzt werden. Wie die Synthese einiger Oligopeptide zeigte, traten bei der inhomogenen Reaktion der beiden Polymere keine Komplikationen auf. Vielmehr blieben die Vorteile der Flüssigphasenmethode und der Polymerreagentien erhalten. Weiter konnte gezeigt werden, daß polymergebundene 1-Hydroxybenzotriazolester erheblich kürzere Kupplungszeiten bei geringerem Reagensüberschuß erlauben, als die anfangs verwendeten polymergebundenen o-Nitrophenolaktivester.

Die Addition von ß-Nitrostyrol an Cystein und dessen Derivate führte zu Produkten, die in der Peptidsynthese eingesetzt werden konnten. Der 2-Nitro-1-phenylethylrest war unter den acidolytischen Abspaltungsbedingungen für in der Peptidsynthese üblicherweise eingesetzten Schutzgruppen stabil und ließ sich durch Behandlung mit Basen wieder abspalten. Die Synthese von polymergebundenen ß-Nitrostyrolen führte zu Produkten, die es erlaubten, Additionen von Cystein-Derivaten oder Glutathion in wäßriger Lösung durchzuführen. Dies eröffnete die Möglichkeit aus einem Peptidgemisch cysteinhaltige Peptide einfach und spezifisch durch reversible Addition zu entfernen. Wie weiter gezeigt werden konnte, entstanden bei der Addition von Cystein und Cysteinpeptiden Diastereomerenpaare, die sich durch Cotton-Effekte hoher molarer Elliptizität auszeichneten, die bei einigen Addukten fast spiegelbildlich waren. Eine Zuordnung der Konfiguration wurde mit chromatographischen und spektroskopischen Methoden versucht, da für weitere chiroptische Untersuchungen die absolute Konfiguration von großer Bedeutung ist.

VI. Literaturverzeichnis

1) E.Fischer und E.Fourneau,
Chem.Ber. 34, 2868 (1901).
2) M.Bergmann und L.Zervas,
Chem.Ber. 65, 1192 (1932).
3) R.B.Merrifield,
J.Am.Chem.Soc. 85, 2149 (1963).
4) E.Bayer, H.Eckstein, K.Hägele, W.A.König,
W.Brüning, H.Hagenmaier und W.Parr,
J.Am.Chem.Soc. 92, 1735 (1970).
5) M.Brenner,
in Peptides 1966, Proc. 8 th Eur.Pept.Symp.,
(H.C.Beyerman, A.van de Linde und W.Maassen van den Brink)
S. 1-7, North Holland Publ.Comp., Amsterdam 1967.
6) E.Wünsch,
Angew.Chem. 83, 773 (1971).
7) M.Mutter, H.Hagenmaier und E.Bayer,
Angew.Chem. 83, 883 (1971).
8) E.Bayer und M.Mutter,
Nature 237, 512 (1972).
9) M.Schattenberg,
Dissertation, Universität Tübingen, 1975.
10) M.Mutter und E.Bayer,
Angew.Chem. 86, 101 (1974).
11) M.Mutter,
Dissertation, Universität Tübingen, 1973.
12) W.Stein,
Dissertation, Universität Tübingen, 1976.
13) M.Weigele, S.L.De Bernardo, J.P.Tengi und W.Leimgruber,
J.Am.Chem.Soc. 94, 5927 (1972).
14) A.Felix und M.H.Jiminez,
J.Chromat. 89, 361 (1974).
15) Y.Wolman, S.Kivity und M.Frankel,
Chem.Commun. 1967, 629.

16) N.M.Weinshenker und C.M.Shen,
Tetrahedron.Lett. 1972, 3281.

17) M.Fridkin, A.Patchornik und E.Katchalski,
in Peptides 1969, Proc. 10th Eur.Pept.Symp.,
(E.Scoffone), S. 166, North Holland Publ.Comp.,
Amsterdam 1971.

18) J.Brown und R.E.Williams,
Can.J.Chem. 49, 3765 (1971).

19) M.Fridkin, A.Patchornik und E.Katchalski,
J.Am.Chem.Soc. 88, 3164 (1966).

20) M.Fridkin, A.Patchornik und E.Katchalski
J.Am.Chem.Soc. 90, 2953 (1968).

21) Th.Wieland und Ch.Birr,
Angew.Chem. 78, 303 (1966).

22) G.T.Panse und D.A.Laufer,
Tetrahedron Lett. 48, 4181 (1970).

23) A.Patchornik, M.Fridkin und E.Katchalski,
in Peptides 1966, Proc. 8th Eur.Pept.Symp.,
(H.C.Beyerman, A.van de Linde und W.Maassen van den Brink)
S. 91, North Holland Publ.Comp., Amsterdam 1967.

24) G.Jung, G.Bovermann, W.Göhring und G.Heusel,
in Peptides, Chemistry, Structure and Biology,
Proc. 4th Amer.Pept.Symp., S. 433,
Ann Arbor-Science Publ. 1975.

25) G.Heusel, G.Bovermann, W.Göhring und G.Jung,
Angew.Chem. 89, 681 (1977).

26) R.Kalir, M.Fridkin und A.Patchornik,
Eur.J.Biochem. 42, 151 (1974).

27) F.Weygand und R.Obermeier,
Z.Naturforschg. 23 b, 1390 (1968).

28) H.Diddens, H.Zähner, E.Kraas, W.Göhring und G.Jung,
Eur.J.Biochem. 66, 11 (1976).

29) F.Weygand, D.Hoffmann und E.Wünsch,
Z.Naturforschg. 21 b, 426 (1966).

30) W.König und R.Geiger,
Chem.Ber. 103, 788 (1970).
31) E.Wünsch,
in Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller),
4. Aufl., Bd. XV/1, S. 37, Thieme, Stuttgart 1974.
32) M.Akiyama, K.Shimizu und M.Narita,
Tetrahedron Lett. 13, 1015 (1976).
33) R.Kalir, A.Warshawsky, M.Fridkin und A.Patchornik,
Eur.J.Biochem. 59, 55 (1975).
34) B.C.Brown und B.C.Subba Rao,
J.Am.Chem.Soc. 78, 2582 (1956).
35) L.A.Carpino,
J.Am.Chem.Soc. 79, 98 (1957).
36) L.A.Carpino,
J.Am.Chem.Soc. 79, 4427 (1957).
37) L.A.Carpino,
J.Am.Chem.Soc. 81, 955 (1959).
38) E.Schnabel,
Liebigs Ann.Chem. 702, 188 (1967).
39) H.Eckstein,
Dissertation, Universität Tübingen, 1970.
40) B.C.Barrass und D.T.Elmore,
J.Chem.Soc. 1957, 3134.
41) W.Göhring,
Dissertation, Universität Tübingen, 1974.
42) S.J.Angyal, P.J.Morris, J.R.Tetaz und J.G.Wilson,
J.Chem.Soc. 1950, 2141.
43) Organikum, S. 189, VEB-Verlag der Wissenschaften,
Berlin 1971.
44) R.Fuchs und D.M.Carlton,
J.Org.Chem. 27, 1520 (1962).
45) G.W.Anderson und A.C.McGregor,
J.Am.Chem.Soc. 79, 6180 (1957).
46) W.H.Wollaston,
Phil.Trans.Roy.Soc. 1810, 223.

47) C.Neuberg,
Ber.Deut.Chem.Ges. 35, 3161 (1902).
48) E.Friedmann,
Beitr.Chem.Physiol.Pathol. 3, 1 (1903).
49) A.Heffter,
Med.Naturwiss.Arch. 1, 81 (1907).
50) F.G.Hopkins,
Biochem.J. 15, 286 (1921).
51) Y.M.Torchinskii, Sulfhydryl and Disulfide Groups
of Proteins, Consultants Bureau, New York 1974.
52) A.L.Davis, W.H.Chambers, D.H.Kelley, D.A.Fell,
J.R.Haynes, K.L.Hulme, L.D.Gaye und T.J.McCord,
J.Med.Chem. 18, 752 (1975).
53) E.Fischer und U.Suzuki,
Chem.Ber. 37, 4575 (1904).
54) E.Fischer und O.Gerngross,
Chem.Ber. 42, 1485 (1909).
55) E.Abderhalden und E.Wybert,
Chem.Ber. 49, 2449 (1916).
56) M.Bergmann und L.Zervas,
Chem.Ber. 65, 1192 (1932).
57) E.Wünsch,
in Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller),
4. Aufl., Bd. XV/1, S. 735, Thieme, Stuttgart 1974.
58) C.R.Harington und T.H.Mead,
Biochem.J. 29, 1602 (1935);
Biochem.J. 30, 1598 (1936).
59) V.du Vigneaud, L.F.Audrieth und H.S.Loring,
J.Am.Chem.Soc. 52, 4500 (1930).
60) H.S.Loring und V.du Vigneaud,
J.Biol.Chem. 111, 385 (1935).
61) R.H.Sifferd und V.du Vigneaud,
J.Biol.Chem. 108, 753 (1935).
62) S.Sakakibara und Y.Shimonishi,
Bull.Chem.Soc.Japan 38, 1412 (1965).

63) P.G.Katsoyannis, A.M.Tometsko, C.Zalut und K.Fukuda,
J.Am.Chem.Soc. 88, 5625 (1966).
64) G.Amiard, R.Heymès und L.Velluz,
Bull.Soc.Chim.France 1956, 698.
65) L.Zervas und D.M.Theodoropoulos,
J.Am.Chem.Soc. 78, 1359 (1956).
66) S.Guttmann,
Helv.Chim.Acta 49, 83 (1966).
67) N.Inukai, K.Nakano und M.Murakami,
Bull.Chem.Soc.Japan 40, 2913 (1967).
68) S.Sakakibara, Y.Nabuhara, Y.Shimonishi und R.Kiyoi,
Bull.Chem.Soc.Japan 38, 120 (1965).
69) R.Camble, R.Purkayastha und G.T.Young,
J.Chem.Soc. C 1968, 1219.
70) M.Friedman, J.F.Cavins und J.S.Wall,
J.Am.Chem.Soc. 87, 3627 (1965).
71) W.C.McCarthy und B.T.Ho,
J.Org.Chem. 26, 4110 (1961).
72) R.L.Heath und A.Lambert,
J.Chem.Soc. 1947, 1477.
73) L.F.Cason und C.C.Wanser,
J.Am.Chem.Soc. 73, 142 (1951).
74) I.Montanini, A.Martini und S.Bersi,
Boll.Chim.Farm. 103, 187 (1964).
75) D.E.Worrall,
J.Am.Chem.Soc. 49, 1598 (1927).
76) H.Wieland,
Chem.Ber. 36, 2567 (1903).
77) J.Meisenheimer und F.Heim,
Chem.Ber. 38, 469 (1905).
78) R.F.Louis-Ferdinand und G.C.Fuller,
J.Pharm.Sci. 58, 1155 (1969).
79) M.S.Masri, J.J.Windle und M.Friedman,
Biochem.Biophys.Res.Commun. 47, 1408 (1972).
80) Organikum, S. 504, VEB-Verlag der Wissenschaften,
Berlin 1971.

81) G.A.Alles,
J.Am.Chem.Soc. 54, 273 (1932).
82) L.L.Raiford und D.E.Fox,
J.Org.Chem. 9, 170 (1944).
83) D.E.Worrall,
J.Am.Chem.Soc. 60, 2841 (1938).
84) C.Doré und C.Viel,
C.R.Acad.Sci.Paris 276, 1641 (1973).
85) C.B.Gairaud und G.R.Lappin,
J.Org.Chem. 18, 1 (1953).
86) D.E.Worrall,
J.Am.Chem.Soc. 56, 1556 (1934);
J.Am.Chem.Soc. 66, 842 (1944).
87) H.B.Hass, A.G.Susie und R.L.Heider,
J.Org.Chem. 15, 8 (1950).
88) O.Schales und H.A.Graefe,
J.Am.Chem.Soc. 74, 4486 (1952).
89) T.I.Crowell und D.W.Peck,
J.Am.Chem.Soc. 75, 1075 (1953).
90) R.A.Heacock, O.Hutzinger und C.Nerenberg,
Can.J.Chem. 39, 1143 (1961).
91) H.G.Padeken, O.von Schickh und A.Segnitz,
in Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller),
4. Aufl., Bd. X/1, S. 411, Thieme, Stuttgart 1971.
92) G.Heusel,
Diplomarbeit, Universität Tübingen, 1974.
93) H.Fouad,
Diplomarbeit, Universität Tübingen, 1974.
94) H.Diddens,
unveröffentlichte Mitteilung.
95) Ch.Gilvarg,
in Peptide Transport in Bacteric and Mammalian Gut,
S. 11, Elsevier, Amsterdam 1972.

96) E.Bayer, K.H.Gugel, K.Hägele, H.Hagenmaier, S.Jessipow, W.König und H.Zähner, Helv.Chim.Acta 55, 224 (1972).

97) E.Kraas, Dissertation, Universität Tübingen, 1975.

98) Th.Wieland und A.Sieber, Liebigs Ann.Chem. 722, 222 (1969).

99) J.D.Glass, A.Talansky, Z.Grzonka, I.L.Schwartz und R.Walter, J.Am.Chem.Soc. 96, 6476 (1974).

100) J.M.Frechet und C.Schuerch, J.Am.Chem.Soc. 93, 492 (1971).

101) H.Albrecht und E.Bayer, unveröffentlichte Mitteilung.

102) G.Jung, H.Fouad und G.Heusel, Angew.Chem. 87, 876 (1975); Angew.Chem.Int.Ed.Engl. 14, 817 (1975).

103) R.W.Roeske, Chem.and Ind. 1959, 1121.

104) H.E.Smith, J.R.Neergaard, E.P.Burrows und F.M.Chen, J.Am.Chem.Soc. 96, 2908 (1974).

105) N.Harada und K.Nakanishi, Acc.Chem.Res. 5, 257 (1972).

106) G.Helmchen und R.Schmierer, Angew.Chem. 88, 770 (1976).

107) F.Marchiori, R.Rocchi und E.Scoffone, Gazz.Chim.Ital. 93, 834 (1963).

108) G.W.Anderson und F.M.Callahan, J.Am.Chem.Soc. 82, 3359 (1960).

109) E.Kraas, Dissertation, Universität Tübingen, 1975.

110) R.Stewart und L.G.Walker, Can.J.Chem. 35, 1561 (1957).

111) H.Zahn und K.Hammerström, Chem.Ber. 102, 1048 (1969).

112) F.Marchiori, R.Rocchi, L.Morader, G.Vidali und E.Scoffone,
J.Chem.Soc. 1967, 89.

113) F.E.King, J.W.Clark-Lewis und R.Wade,
J.Chem.Soc. 1957, 880.

114) V.du Vigneaud und G.L.Miller,
J.Biol.Chem. 118, 469 (1936).

115) M.Fridkin, A.Patchornik und E.Katchalski,
J.Am.Chem.Soc. 87, 4646 (1965).

116) H.Frank, G.J.Nicholson und E.Bayer,
J.Chromatog.Sci. 15, 174 (1977).

117) R.Charles, U.Beitler, B.Feibusch und E.Gil-Av,
J.Chromatog.Sci. 112, 121 (1975).

118) H.E.Smith, L.J.Schaad, R.B.Banks, C.J.Wiant und C.F.Jordan,
J.Am.Chem.Soc. 95, 811 (1973).

119) N.Harada und K.Nakanishi,
Acc. Chem.Res. 5, 257 (1972).

120) A.Eisele,
Dissertation, Universität Tübingen, 1974.

121) W.A.König, W.Löffler, W.H.Meyer und R.Uhmann,
Chem.Ber. 106, 816 (1973).

Herrn H. Bartholomä und Frl. S. Naumann danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Herrn Wurmstich danke ich für die Durchführung der Elementaranalysen.

Herrn Dipl. chem. G. Bovermann danke ich für die Aufnahme und Interpretation der NMR-Spektren.

Lebenslauf

24.10.1948	Geboren in Tübingen
1955 - 1959	Volksschule in Tübingen
1959 - 1967	Uhland-Gymnasium, humanistisches Gymnasium, Tübingen
1967 - 1969	Wehrdienst in Stadt Allendorf (Kreis Marburg)
1969	Beginn des Chemiestudiums an der Universität Tübingen
1971	Diplomvorprüfung
1974, Dez.	Diplom an der Universität Tübingen
1975, Jan.	Beginn der Dissertation am Chemischen Institut der Universität Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. G. Jung

Meine akademischen Lehrer waren Frau Professor Dr. S. Kemmler-Sack und die Herren Professoren und Dozenten M. Baumann, E. Bayer, V. Braun, M. Brendle, J. Gelinek, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, G. Jung, H. Kessler, W. König, W. Kraus, H. Krüger, D. Krug, E. Lindner, H. Mauser, E. Müller, D. Oelkrug, G. Opitz, H. Pauschmann, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, W. Schweizer, F. F. Seelig, H. Stegmann, E. Stumpp, H. Suhr und W. Zeil.